

**Charakterisierung des**  
***Burkholderia cenocepacia***  
**Aquaglyceroporins**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Dorothea Wree**

Kiel 2010

Referent:

Prof. Dr. Eric Beitz

Korreferent:

Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Mai 2010

Zum Druck genehmigt:

1. Juni 2010

Prof. Dr. Lutz Kipp  
(Dekan)

Für meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

V

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Orthodoxe Aquaporine/Aquaglyceroporine .....	1
1.1.1	Struktur von Aquaporinen .....	3
1.1.2	Struktur von orthodoxen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen im Vergleich .....	6
1.1.3	Funktion von Aquaporinen .....	7
1.1.4	Humane Aquaporine und ihre Funktion im Körper .....	8
1.1.5	Pharmazeutische Relevanz von Aquaporinen.....	10
1.2	<i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	10
1.2.1	<i>Burkholderia</i> Aquaglyceroporin .....	11
1.3	Vergleich von phänotypischen und biophysikalischen Assay-Systemen....	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>15</b>
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	15
2.2	Geräte .....	16
2.3	Oligonukleotide (Primer).....	19
2.4	DNA-Sequenz .....	21
2.5	Verwendete Plasmide .....	22
2.6	Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Stämme .....	25
2.7	Verwendete <i>Escherichia coli</i> - Stämme.....	25
2.8	Puffer und Lösungen .....	26
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	PCR-Polymerasekettenreaktion .....	33
3.1.2	Isolierung und Reinigung von DNA .....	33
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	35
3.1.5	Restriktionsverdau von DNA .....	36

## Inhaltsverzeichnis

3.1.6	Ligation .....	36
3.1.7	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	36
3.1.8	<i>E. coli</i> - Dauerkulturen.....	38
3.1.9	Klonierungsarbeiten .....	39
3.1.10	DNA - Sequenzierung .....	41
3.1.11	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i> .....	42
3.1.12	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	43
3.1.13	Cotransformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	43
3.2	Proteinchemische Methoden.....	44
3.2.1	Präparation der Membranproteine aus <i>S. cerevisiae</i> .....	44
3.2.2	Präparation der Membranproteine aus <i>E. coli</i> .....	45
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
3.2.4	Westernblot.....	46
3.2.5	Wachstumstest von <i>S. cerevisiae</i> auf Agarplatten .....	47
3.2.5.1	Methylamin-Efflux-Assay.....	48
3.2.5.2	Glycerol-Efflux-Assay.....	51
3.2.5.3	Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay.....	52
3.2.6	Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur.....	55
3.2.6.1	Prinzip der Stopped-Flow-Messung .....	55
3.2.6.2	<i>E. coli</i> -Messungen .....	56
3.2.6.3	Protoplasten von <i>S. cerevisiae</i> .....	57
3.2.6.4	Vesikel von <i>S. cerevisiae</i> .....	60
3.2.6.5	Auswertung der Stopped-Flow-Parameter .....	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
4.1	Wachstumsassays mit <i>S. cerevisiae</i> .....	67
4.1.1	Untersuchung der Methylamin-Leitfähigkeit .....	67
4.1.2	Untersuchung der Glycerol-Leitfähigkeit .....	69
4.1.3	Untersuchung der Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit .....	71
4.2	Expressionskontrollen der BccGlpF-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i> .....	75
4.2.1	Expressionskontrolle durch GFP im pUG36.....	75
4.2.2	Expressionskontrolle durch HA-Tag im pDR196HA.....	76
4.2.3	Expressionskontrolle bei Cotransformation.....	78
4.3	Expressionskontrolle in <i>E. coli</i> .....	78

4.4	Messungen mit <i>E. coli</i> in der Stopped-Flow-Apparatur .....	80
4.4.1	Messungen der Kontrollen .....	80
4.4.2	Messungen des BccGlpF .....	82
4.5	Messungen von Hefeprotoplasten in der Stopped-Flow-Apparatur .....	85
4.5.1	Messungen der Kontrollen .....	88
4.5.2	Messungen der BccGlpF-Mutanten.....	92
4.6	Vesikel von <i>S. cerevisiae</i> .....	97
4.6.1	Größenbestimmung von Hefevesikeln .....	97
4.6.2	Expressionskontrolle der Hefevesikel .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>101</b>
5.1	Wachstumsassays mit <i>S. cerevisiae</i> .....	101
5.2	Expression der BccGlpF-Mutanten.....	104
5.3	Entwicklung der Stopped-Flow-Messungen .....	106
5.4	Leitfähigkeiten der BccGlpF-Mutanten in der Stopped-Flow-Apparatur ...	110
5.5	Auswirkungen der Veränderungen im BccGlpF .....	111
5.6	Vesikelpräparation.....	114
5.7	Ausblick.....	115
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>135</b>
9.1	DNA- und Proteinsequenz des BccGlpF .....	135
9.2	Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	137





## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
Aqua bidest.	gereinigtes Wasser
ar/R	aromatische/Arginin-Region
AUC	area under the curve
b	Base
bp	Basenpaare
Bcc	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.	<i>Escherichia</i>
E <sub>A</sub>	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlpF	glycerol facilitator aus <i>Escherichia coli</i>
HA	Hämagglutinin
hAQP1	humanes Aquaporin 1
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth ( <i>E. coli</i> -Nährmedium)
M9	Minimalmedium zum Wachstum von <i>E. coli</i>
MCS	multiple cloning site
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	2-(N-Morpholino)-propansäure
NPA	Asparagin-Prolin-Alanin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte, bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline

## Abkürzungsverzeichnis

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PdI	Polydispersitätsindex
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rAQP1	AQP1 aus der Ratte
S.	<i>Saccharomyces</i>
SD	synthetisches Dextrose Minimalmedium zur Selektion transformierter <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transformation and storage solution
YNB	yeast nitrogen base
YPD	yeast extract peptone dextrose (reichhaltiges Nährmedium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )

# 1 Einleitung

## 1.1 Orthodoxe Aquaporine/Aquaglyceroporine

Das erste funktionelle Aquaporin (AQP) wurde 1992 von Peter Agre beschrieben. Er fand das humane AQP1 (hAQP1) zufällig bei der Untersuchung von Rhesusproteinen in Erythrozyten (Agre *et al.*, 1993). Für diese Entdeckung erhielt Peter Agre im Jahre 2003 den Nobelpreis (Agre, 2004). Schon vorher wurde ein spezialisiertes Protein vermutet, welches den Transport von Wasser durch die biologischen Membranen unterstützt und den schnellen Wasserfluss durch bestimmte Lipidmembranen erklären würde (Gonen & Walz, 2006; Preston *et al.*, 1992). Obwohl Wasser durch die Lipidmembran hindurch diffundieren kann, ist die Diffusion nicht schnell genug, um gewisse physiologische Prozesse zu erklären (Kozono *et al.*, 2002). Vielfache Beobachtungen in verschiedenen Systemen mit hoher Membranwasserpermeabilität, wie die Sammelrohrepithelzellen der Nieren und Erythrozyten, ließen den Schluss zu, dass die reine Diffusion durch die Lipiddoppelmembran nicht ausreicht (Verkman, 1989). Auch die für die einfache Diffusion hohe benötigte Aktivierungsenergie ( $E_a > 10 \text{ kcal/mol}$ ) stimmte nicht mit der ermittelten niedrigen Aktivierungsenergie ( $E_a < 5 \text{ kcal/mol}$ ) in manchen Zellen überein.

Die Entdeckung des AQP3 zeigte, dass Aquaporine neben Wasser auch andere Solute leiten können wie zum Beispiel Harnstoff (Echevarria *et al.*, 1994).

Die Aquaporine werden zu der Familie der MIP - major intrinsic proteins - gezählt (Agre, 2006). Unter MIP versteht man transmembranäre Transportkanäle, die Wasser und kleine Solute leiten können (Gomes *et al.*, 2009). Aquaporine sind hocheffizient und zugleich außergewöhnlich selektiv, sie können bis zu 3 Milliarden Wassermoleküle pro Sekunde leiten, was der freien Diffusion von Wasser entspricht (Zeidel *et al.*, 1992). Das Wasser und auch die anderen ungeladenen Moleküle können frei in Richtung des osmotischen bzw. chemischen Gradienten wandern. Die osmotische Wasserregulation ist entscheidend für alle Lebensformen: deshalb sind Aquaporine fast überall in der Natur zu finden (Benga, 2009). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind über 450 verschiedene Aquaporine bekannt geworden, die ubiquitär vorkommen, also sowohl in Pflanzen, Pilzen, Tieren, Bakterien als auch im Menschen. Im Menschen alleine sind 13 verschiedene Aquaporine beschrieben, die

gemeinsam den Wasserhaushalt in verschiedensten Geweben regulieren: AQP0 bis AQP12 (Gomes *et al.*, 2009). Sieben von ihnen zählen zu den orthodoxen Aquaporinen: AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 und 8 und vier von ihnen zu den Aquaglyceroporinen: AQP3, 7, 9 und 10 (Zardoya, 2005). Die Einteilung erfolgt aufgrund ihrer Funktionalität: Die orthodoxen Aquaporine leiten nur Wasser und die Aquaglyceroporine leiten neben Wasser noch kleine ungeladene Moleküle wie Glycerol, Harnstoff oder Ammoniak (Zardoya, 2005).

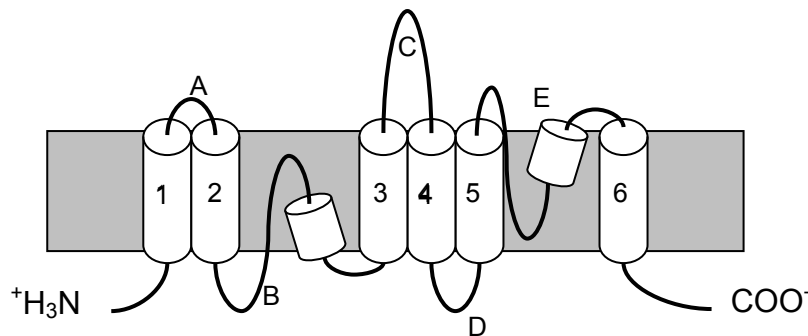
Die Aquaporine 11 und 12 scheinen zu einer eigenen Gruppe zu gehören (Nozaki *et al.*, 2008). Bis jetzt ist es nicht gelungen, diese beiden Aquaporine in ihrer Leitfähigkeit für Solute zu charakterisieren. Es wird vermutet, dass diese Aquaporine nicht zur Oozytenmembran transportiert werden und somit für Untersuchungen noch nicht herangezogen werden konnten (Itoh *et al.*, 2005; Gorelick *et al.*, 2006).

Geladenen Moleküle und Ionen werden von Aquaporinen strikt ausgeschlossen, somit ist ein Aufrechterhalten des lebensnotwendigen und natürlich vorliegenden elektrochemischen Gradienten gewährleistet. Besonders der Ausschluss von Protonen ist überlebensnotwendig, da dieser die unterschiedlichen Protonenkonzentrationen zwischen intra- und extrazellulärem Raum garantiert. Verwunderlich scheint der Ausschluss auf den ersten Blick, da Wasser selbst ein guter Protonenleiter ist, nach dem Grotthuss-Mechanismus können die Protonen sehr schnell von Wassermolekül zu Wassermolekül springen (Wraight, 2006).

Die menschliche Körpermasse besteht zu 70% aus Wasser. Aquaporine regulieren den Wasserhaushalt im Menschen z.B. in den unterschiedlichen Kompartimenten der Niere, in den Erythrozyten, in der Augenlinse und im Gehirn. Eine Fehlfunktion der Aquaporine haben weitreichende Konsequenzen, was sich in verschiedenen Krankheiten, wie NDI - nephrogener Diabetes insipidus, grauer Star (Katarakt) oder einen neuronalen Hörverlust widerspiegeln kann (Yasui, 2004).

### 1.1.1 Struktur von Aquaporinen

Aquaporine zeichnen sich durch eine gemeinsame Grundstruktur aus.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Aquaporine in der Seitenansicht. Mit den sechs membrandurchspannenden Domänen (1 - 6) und den verbindenden fünf Schleifen (A - E) (in Anlehnung an Beitz & Schultz, 1999).

Die Abbildung 1.1 gibt eine planare schematische Grundstruktur eines Aquaporins in einer Zellmembran wieder. Die Größe der verschiedenen Aquaporin-Proteinsequenzen ist dabei unterschiedlich, bewegt sich aber um die 280 Aminosäuren. Aquaporine bestehen aus sechs membrandurchspannenden Domänen, das C- und N-terminale Ende liegt intrazellulär. Die sechs Helices werden untereinander von fünf Schleifen A bis E verbunden. Drei dieser Schleifen liegen außerhalb der Membran, zwei davon durchqueren die Membran nicht vollständig, sondern nur zur Hälfte (Zardoya, 2005). Der Kanal ist um die 20 Å lang und ist geprägt durch zwei Verengungen, eine der Engstelle wird gebildet durch die sich gegenüberliegenden Halbschleifen B und E, die zweite Engstelle ist weiter extrazellulär gelegen (Agre, 2006).

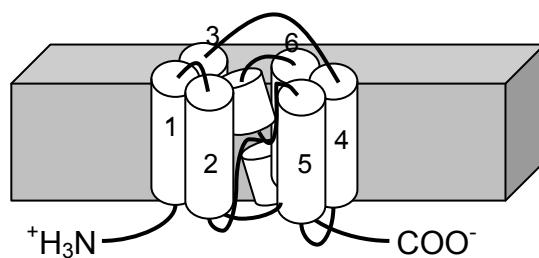
Die mittlere Engstelle zeichnet sich aus durch die hochkonservierten Aminosäuren Asparagin (N), Prolin (P) und Alanin (A), kurz NPA-Motiv, welches einen Durchmesser von rund 4 Å vorweist (Yasui, 2004). Die zweite Engstelle hat einen noch geringeren Durchmesser von lediglich 2,8 Å bei orthodoxen Aquaporinen und 3,4 Å bei Aquaglyceroporinen (Wu & Beitz, 2007). Sie kennzeichnet sich durch 3 bis 4 konservierte, teils aromatische Aminosäuren, daher auch die Bezeichnung: aromatisch/Arginin-Region, kurz ar/R-Region (Yasui, 2004).

Ein Aquaporin zeichnet sich somit durch zwei Filterregionen aus, der ar/R-Region und dem NPA-Motiv. Die beiden Filterregionen können separat betrachtet werden,

aber ihre Aufgaben ergänzen sich - das Zusammenspiel beider ist entscheidend, was kürzlich erst bei dem Ausschluss von Protonen und Kationen entdeckt wurde (Wu *et al.*, 2009).

Die ersten Vorstellungen zur Form des AQP1 gab es 1994 in Form des „hourglass“-Models, was einer Sanduhr-Form entspricht (Jung *et al.*, 1994). Im Jahre 2000 folgten genaue strukturelle Aufklärungen des AQP1 durch Cryo-Elektronenmikroskopie (Murata *et al.*, 2000).

In der folgenden Abbildung 1.2 ist das Aquaporin in seiner dreidimensionalen Struktur aufgezeigt.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Aquaporine in seiner dreidimensionalen Struktur. Mit den sechs membrandurchspannenden Domänen (1 - 6) (in Anlehnung an Agre, 2004).

Vier solcher Aquaporin-Monomere lagern sich zu einem Tetramer zusammen, wobei jedes Monomer seine Funktionsfähigkeit behält (Schäffner *et al.*, 1998).

Die Sequenzähnlichkeiten innerhalb eines Aquaporins lassen den Schluss zu, dass es durch Genduplikation entstanden ist (Beitz & Schultz, 1999).

### NPA-Motiv

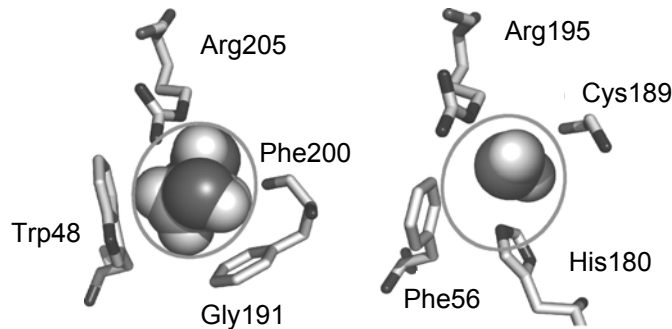
Wie in Abbildungen 1.1 und 1.2 zu sehen ist, durchdringen die Halbhelices der Schleifen B und E die Membran nicht vollständig. Zur Kanalmitte hin am Ende der beiden Helices befindet sich das hochkonservierte NPA-Motiv. Das NPA-Motiv dient der Größenselektion und der Spezifität des Kanals (Murata *et al.*, 2000). Die Asparagine beider NPA-Motive sind an dem Transport der einzelnen Wassermoleküle beteiligt. Das Wasser tritt in den Kanal ein und orientiert sich dabei nach dem in dem Kanal vorherrschenden lokalen elektrischen Feld, welches durch die positiven Partialladungen der  $\alpha$ -Helices der beiden Halbschleifen B und E hervorgerufen wird. Das Wassermolekül geht mit dem Sauerstoff voran, die beiden

Wasserstoffe sind extrazellulär gerichtet. Sobald sie die Asparagine des NPA-Motives erreichen, kommt es durch Wechselwirkungen des Wasser-Sauerstoffs und der Asparagin-Wasserstoffe zu einer Drehung um 180°. Das Wasser verlässt die Pore nun mit den Wasserstoffen des Wassers voran (Tajkhorshid *et al.*, 2002).

### **ar/R-Region**

Die ar/R-Region liegt am extrazellulären Eingang der Pore und bildet einen weiteren wichtigen Filterbereich. Sie dient der Größenselektion und elektrostatischen Abstoßung. Die ar/R-Region setzt sich aus vier Aminosäuren zusammen, welche sich bei den Aquaporinen und Aquaglyceroporinen unterscheiden. Gemeinsam haben fast alle Aquaporen den positiv geladenen Aminosäure-Rest Arginin, die anderen drei Aminosäuren unterscheiden sich je nachdem, ob ein orthodoxes Aquaporin oder Aquaglyceroporin vorliegt (Kozono *et al.*, 2002). AQP1, als der Prototyp eines wasserspezifischen Aquaporins, hat neben dem Arg195 noch Phe56, His180 und Cys189 (Nummerierung nach AQP1 der Ratte). Nach de Groot und Grubmüller wird das Wassermolekül durch die hydrophobe Seitenkette des Phenylalanins aus der ar/R-Region des AQP1 so orientiert, dass es zu starken Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Arginin und Histidin kommt (de Groot & Grubmüller, 2001). Das hydrophile Histidin in der ar/R-Region gilt als eine entscheidende Aminosäure für die Wasserleitfähigkeit eines Aquaporins (Stroud *et al.*, 2003). Das obsolete Diuretikum Quecksilber(II)chlorid konnte der Interaktion mit dem Cystein zugeordnet werden, es bindet an die Sulfhydrylgruppe und verschließt die Pore somit (Preston *et al.*, 1993).

Das positiv geladene Arginin schirmt durch elektrostatische Abstoßung den Wasserkanal vor Protonen und anderen positiv geladenen Ionen ab (de Groot & Grubmüller, 2001). Mit 2,8 Å ist die ar/R-Region der Aquaporen gerade so groß, dass ein einzelnes Wassermolekül den Kanal passieren kann. Die Größenverhältnisse der ar/R-Regionen des Aquaglyceroporins *E. coli* GlpF und AQP1 sind in Abbildung 1.3 vergleichend dargestellt.



**Abbildung 1.3:** Darstellung der ar/R-Region des *E. coli* GlpF (PDB # 1FX8) mit Glycerol (linke Abbildung) und des AQP1 (PDB # 1FQY) mit Wasser (rechte Abbildung). Mittig ist jeweils der Umfang, den ein Glycerolmoleküle beanspruchen würde, angedeutet, weiterhin sind die Aminosäuren mit ihren jeweiligen Positionen angegeben (Beitz et al., 2009).

Das *E. coli* GlpF, der Prototyp für einen Glycerol leitenden Kanal, hat in der ar/R-Region neben dem Arg205 noch Trp48, Gly191 und Phe200. Insgesamt ist es somit hydrophober als das AQP1 und ermöglicht die Passage von Glycerol, Harnstoff und anderen ungeladenen Molekülen (Fu et al., 2002).

### 1.1.2 Struktur von orthodoxen Aquaporinen und Aquaglyceroporinen im Vergleich

Orthodoxe Aquaporine und Aquaglyceroporine lassen sich in ihrer Struktur unterscheiden. Sequenzbasierte Unterscheidungsmerkmale lassen bisher noch keine eindeutige Entscheidung zu, ob es sich um ein Aquaporin oder Aquaglyceroporin handelt (Hub & de Groot, 2008). Zur Diskussion stehen, neben dem Größenausschluss der ar/R-Region, verschiedene Ansätze: polare oder unpolare ar/R-Region (Thomas et al., 2002), hydrophile oder hydrophobe bzw. engere und weitere Umgebung im Kanal (Wang et al., 2005; Unger, 2000), verkürzte Schleife A bei *E. coli* GlpF (Gonen & Walz, 2006), fünf Schlüsselpositionen (Froger et al., 1998), sowie einzelne Aminosäuren in der Nähe des NPA-Motives (de Groot & Grubmüller, 2001).



### 1.1.3 Funktion von Aquaporinen

Im Folgenden werden die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit der Aquaporine näher dargestellt.

#### **Wasserleitfähigkeit**

Aufgrund der Enge und Bewegung der Wassermoleküle im Aquaporin werden Wasserstoffbrücken benachbarter Wassermoleküle gelöst und stattdessen Brücken zum Protein ausgebildet. Der erwartete Energiebedarf wird durch einzelne Aminosäuren, welche sehr präzise Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, kompensiert. Dieses präzise Zusammenspiel erklärt auch die hohen Durchflussraten (de Groot & Grubmüller, 2004).

In der ar/R-Region sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen im Vergleich zum Bulkwasser geschwächt. Weiter intrazellulär gegenüber den beiden NPA-Motiven ragt im Beispiel des AQP1 Phe24 in die Pore hinein und erhöht die Interaktion zwischen Wassermolekülen und den Asparaginen, an dieser Stelle findet die stärkste Protein-Wasser-Wechselwirkung statt. Das Wasser wird durch die beiden NPA-Motive gedreht, so dass es die Pore insgesamt um 180° gedreht verlässt (de Groot & Grubmüller, 2004). Um die NPA-Motive gibt es hydrophobe Aminosäuren, die eine gewisse limitierende Energiebarriere für die Wassermoleküle bilden (siehe Abbildung 1.4).

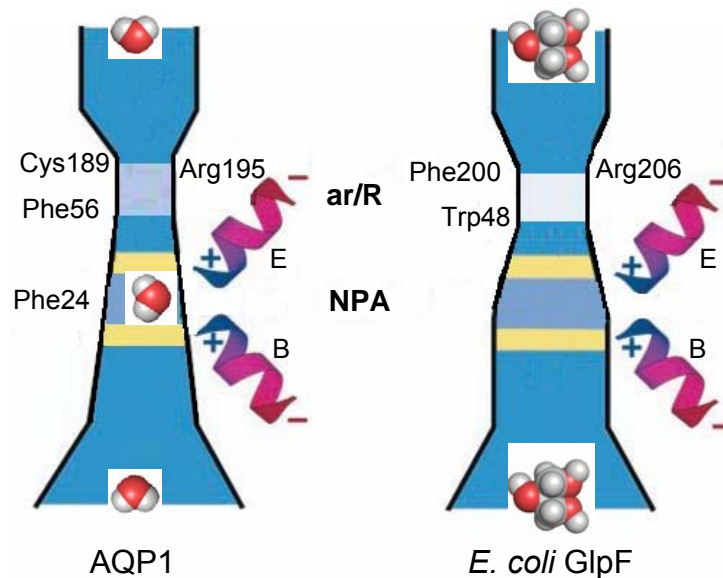
#### **Glycerol-Leitfähigkeit**

Die Leitfähigkeit des *E. coli* GlpF für Glycerol konnte schon 1980 gezeigt werden (Heller *et al.*, 1980). Die Zuordnung zu der Aquaporin-Familie erfolgt dann allerdings erst Anfang der 90er Jahre (Agre *et al.*, 1993).

Es gibt vor allem drei Wasserstoffbrückenbindung-Interaktionsstellen zwischen Glycerol und dem Kanal (Stroud *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2000).

Die erste bildet dabei Tyr138 am Poreneingang. Eine weitere ist Arg206 in der ar/R-Region, welche Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Hydroxylgruppen des Glycerols bildet. Dadurch wird der Kohlenstoffrücken des Glycerols nah an die hydrophobe Ecke, welche durch die zwei in der ar/R-Region vorkommenden Aromaten, Trp48 und Phe200, gebildet wird, gedrängt. Eine Reihe Carbonyl-Sauerstoffatome stehen einer hydrophoben Wandung gegenüber (Unger, 2000). Die dritte Interaktionsstelle bilden die beiden Asparagine der NPA-Motive.

Abbildung 1.4 gibt einen schematischen Überblick über die Wasserleitfähigkeit des AQP1 und die Glycerol-Leitfähigkeit des *E. coli* GlpF.



**Abbildung 1.4:** Schematischer Mechanismus der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit durch AQP1 bzw. *E. coli* GlpF, sowie die schematische Kanalform der beiden Aquaporine. Hervorgehoben wurde die ar/R-Region mit ihren jeweiligen Aminosäuren, die NPA-Region mit den Halbschleifen B und E und in gelb zu sehen ein Bereich hydrophober Reste (in Anlehnung an de Groot & Grubmüller, 2001).

### 1.1.4 Humane Aquaporine und ihre Funktion im Körper

Zur besseren Darstellung der Lokalisation und Funktion humaner Aquaporine wurde eine Tabelle gewählt. Es handelt sich hierbei um eine Auswahl.

Isoform	Lokalisation Funktion (und evtl. Auswirkungen des Aquaporins)
AQP0	Augenlinse Linsentransparenz (→ Katarakt)
AQP1	Erythrozyten, Niere Wasserrückresorption

AQP2	Niere Wasserrückresorption (→ Diabetes insipidus)
AQP3	Niere Wasserrückresorption
AQP4	Gehirn Blut-Hirn-Schranke (→ Hirnödeme)
AQP5	Auge, Magen-Darm Tränenflüssigkeit (→ Sjögren-Syndrom)
AQP6	Niere
AQP7	Niere, Spermien, Fettzellen Wasserrückresorption, Fettmetabolismus
AQP8	Herz, Lunge, Leber, Niere, Plazenta, Gehirn
AQP9	Leber Gluconeogenese
AQP10	Gastrointestinaltrakt
AQP11	Niere
AQP12	Pankreas Sekretion von Verdauungsenzymen

**Tabelle 1.1:** Auflistung der Lokalisation, Funktion und evtl. Auswirkungen der menschlichen Aquaporine, diese Tabelle beschränkt sich auf eine Auswahl (Verkman, 2009; Rojek et al., 2008; Beitz et al., 2006a; Itoh et al., 2005; Liu et al., 2005; Morishita et al., 2005; King et al., 2004; Ikeda et al., 2002; Nielsen et al., 2002; Hatakeyama et al., 2001; King et al., 2001; Tsubota et al., 2001; Fotiadis et al., 2000; Francis et al., 2000; Manley et al., 2000; Verkman, 2000; Borgnia et al., 1999; Yasui et al., 1999; Ishibashi et al., 1998; Tsukaguchi et al., 1998; Ishibashi et al., 1997; Ma et al., 1997; Deen et al., 1994; Preston et al., 1994; Fushimi et al., 1993; Nielsen et al., 1993).

### 1.1.5 Pharmazeutische Relevanz von Aquaporinen

Am 3. August 2009 hat die EMEA - Europäische Arzneimittelbehörde - den ersten oralen selektiven V<sub>2</sub>-Vasopressin-Rezeptor-Antagonisten in Europa zugelassen. Der Wirkstoff der Klasse der Vaptane trägt den Namen Tolvaptan und ist unter dem Handelsnamen Samsca<sup>TM</sup> erhältlich.

Die Gruppe der Vaptane hat einen ganz eigenen Angriffspunkt im Kreise der Diuretika. Vasopressin aktiviert V<sub>2</sub>-Rezeptoren im Sammelrohr der Niere und führt somit zu einer Rückresorption großer Mengen an Wasser. Das Tolvaptan hemmt nun diese Rückresorption von Wasser über Aquaporine, es kommt zu einer reinen Wasserdiauresesteigerung ohne aber die Elektrolytausscheidung zu beeinflussen. Die Zulassung des Tolvaptans erfolgte für die Behandlung der Hyponatriämie beim antidiuretischen Syndrom, kurz SIADH. Von Hyponatriämie spricht man sobald der Natriumspiegel unter 135 mmol/l fällt. Sie zählt zu einer der häufigsten Elektrolytstörungen im Krankenhaus, tritt bei etwa 15-30% aller stationär behandelten Patienten auf. Eine Hyponatriämie kann von Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen bis hin in schweren Fällen zu Krampfanfällen und Koma führen. Die bei SIADH zugrunde liegende inadäquate hohe Freisetzung des antidiuretischen Hormons Vasopressin wiederum ist induziert durch Tumorerkrankungen im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms oder Einnahme von ZNS-wirksamen Substanzen wie Antiepileptika, Neuroleptika oder Antidepressiva (Gräfe & Siebenand, 2009).

### 1.2 *Burkholderia cenocepacia*

*Burkholderia cepacia* complex fasst neun nah verwandte Arten zusammen (Mahenthiralingam *et al.*, 2005), wobei eine der Arten das hier untersuchte *Burkholderia cenocepacia* (Bcc) ist. Der Name leitet sich ab von dem Entdecker Walter Burkholder. Er konnte das Pflanzenpathogen schon 1949 aus der faulenden Zwiebelknolle isolieren (Burkholder, 1949). Allerdings wurden erst 1992 die ähnlichen Pathogene aus der Gattung der *Pseudomonas* zu einer neuen Gattung, der *Burkholderia*, zugeordnet.

In der Pflanzenwelt hat das Pathogen durchaus auch synergistische Effekte. Es ist in der Lage antimikrobielle Komponenten zum Schutz der Pflanzen zu produzieren,

genauso wie Faktoren, die das Pflanzenwachstum verstärken. Weiterhin ist es in der Lage die Konzentration von Schadstoffen aus dem Grundwasser zu erniedrigen (LiPuma *et al.*, 2002).

Die bis auf die Verursachung der Zwiebfäule durchaus positiven Aspekte des Bcc stehen im Kontrast zu der fatalen Infektion, die es am Menschen als opportunistischer Keim auslösen kann. Am Menschen hat es sich zu einem schweren Krankenhausproblemkeim mit vielfacher Antibiotikaresistenz entwickelt. Bcc ist nicht für gesunde Personen gefährlich, sondern immungeschwächte und besonders Patienten mit Mukoviszidose, sind betroffen. Jede der neun Unterarten von *Burkholderia cepacia* wurde schon bei infizierten zystischen Fibrose-Patienten gefunden (Mahenthiralingam *et al.*, 2008).

Eine Infektion von Mukoviszidose-Patienten mit Bcc-Bakterien kann zu einer Sepsis und Lungenentzündung führen. Insgesamt ist die Prognose für Bcc-infizierte Patienten in Bezug auf Morbidität und Mortalität wesentlich schlechter als für ihre nicht-infizierte Kontrollgruppe (Webb & Govan, 1998).

Auch steigt die Zahl der Erkrankten weiter. Eine Übertragung ist von Patient zu Patient möglich, genauso aber auch durch verunreinigte Desinfektionsmittel oder auch durch die orale Aufnahme von kontaminierten Wasser oder Pflanzenteilen (Uhl, 2009; Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

Insgesamt kann man sagen, dass die Infektion mit Bcc bei den Patienten aufgrund der leichten Übertragung auf andere Personen zu einer starken Einschränkung in ihrem Leben führt.

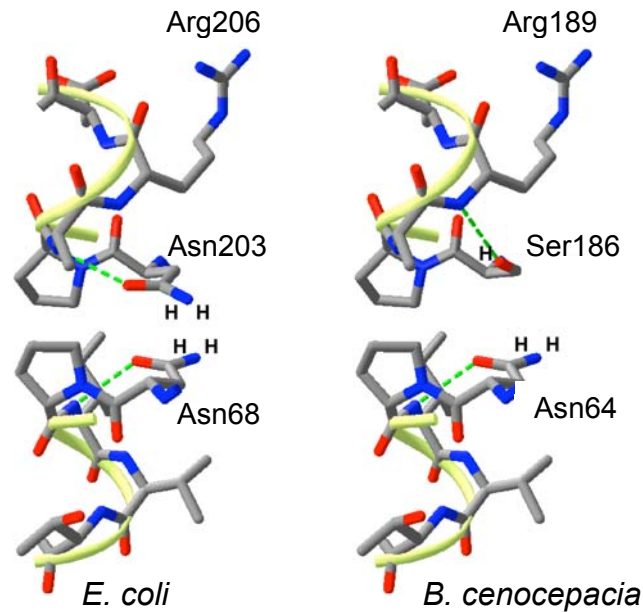
### 1.2.1 ***Burkholderia Aquaglyceroporin***

Das *Burkholderia cenocepacia* Aquaporin, kurz BccGlpF, konnte man anhand seiner Sequenz und struktureller Eigenschaften eher den Aquaglyceroporinen zuordnen. Es hat eine Länge von 238 Aminosäuren und gehört damit zu den kürzeren Aquaglyceroporinen. Im Gegensatz zu anderen Vertretern hat es nur kurze N- und C-Termini. Das *E. coli* GlpF hat 282 Aminosäuren (Fu *et al.*, 2000).

Das BccGlpF weist eine Besonderheit auf. Die hochkonservierten NPA-Motive sind beim BccGlpF verändert. Beim ersten NPA-Motiv ist das Alanin durch ein Isoleucin ersetzt, ist somit also korrekterweise als NPI zu bezeichnen. Diese Abwandlung ist in der Position allerdings auch von anderen Aquaporinen bekannt (Beitz, 2005;

Uzcategui *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu ist die Abwandlung im zweiten NPA-Motiv ungewöhnlich, hier ist das Asparagin durch Serin ersetzt. Somit entsteht kein NPA, sondern ein SPA. Diese Abwandlung ist noch nicht weiter erforscht. 2005 wurde veröffentlicht, dass es verschiedene ungewöhnliche NPA-Motive gibt. Von 450 betrachteten Aminosäuresequenzen hatten nur 7% ein verändertes zweites NPA-Motiv, wobei es meist zu einer Veränderung an der zweiten oder dritten Position kommt (Zardoya, 2005). Eine weitere Erforschung dieses Gebietes gab es allerdings nicht, obwohl die molekulare Struktur-Funktionsbeziehung theoretisch hochinteressante Aspekte eröffnet. In Abbildung 1.5 wird deutlich, welche Konsequenz diese Veränderung um eine Aminosäure im Modell hat. Der Vergleich des *E. coli* GlpF mit dem BccGlpF lässt folgendes vermuten: Anzahl und Orientierung der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind verschieden. Ser186 im BccGlpF ist ein einfacher Wasserstoffbrücken-Donor, wogegen Asn203 des *E. coli* GlpF zwei Wasserstoffbrücken-Donorstellen aufweist. Auch die mögliche Ausrichtung der Wasserstoffbrücken scheint verschieden, das Asn203 im *E. coli* GlpF interagiert mit dem Amidstickstoff an Position 205, wogegen das Ser186 des BccGlpF mit dem Amidstickstoff an Position 189 in Kontakt tritt. Der Wasserstoff des BccGlpF-Serins interagiert dementsprechend erst mit einem Amidstickstoff einer späteren Aminosäure. Zusätzlich ist auffällig, dass die einzig mögliche Wasserstoffbrückenbindung der Mitte des Kanals abgewandt scheint. Hierbei handelt es sich um eine reine Modellvorstellung, da es zum BccGlpF noch keine erklärende Kristallstruktur gibt.

Die Helix-cap-Struktur wird besonders durch das Prolin und das benachbarte Asparagin oder Serin hervorgerufen. Prolin führt durch seine Ringstruktur zu Richtungswechseln und ist somit häufig in den Knicken gefalteter Proteinketten zu finden, Asparagin oder auch Serin neigen durch ihre Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Unterbrechung der Helices.



**Abbildung 1.5:** Modell der Helix-cap-Struktur der NPA-Region von *E. coli* GlpF und *BccGlpF*. Die Aminosäuren des NPA-Motives und der ar/R-Region wurden hervorgehoben. In *BccGlpF* bewirkt der Austausch zum Serin neben dem Wegfall einer Wasserstoffbrückenbindung auch eine Änderung in der Ausrichtung möglicher Wasserstoffbrückenbindungen.

Es gibt einige Veröffentlichungen zu mikrobiellen Aquaglyceroporinen (Tanghe *et al.*, 2006; Froger *et al.*, 2001; Hohmann *et al.*, 2000). Allerdings sind bisher nur drei andere Unterarten von *Burkholderia* in einer Auflistung von möglichen Aquaporinen aus pro- und eukaryotischen Mikroorganismen genannt worden (Tanghe *et al.*, 2006).

### 1.3 Vergleich von phänotypischen und biophysikalischen Assay-Systemen

Für die Charakterisierung von Aquaporinen werden im Arbeitskreis Wachstumsassays mit *S. cerevisiae* und Messungen von *Xenopus laevis* Oozyten angewendet. Die Vorteile der phänotypischen Hefewachstumsassays liegen in der Möglichkeit eines vergleichweisen schnellen Überblick über die Eigenschaften der Aquaporine, außerdem kann eine größere Menge verschiedener Aquaporine parallel untersucht werden. Der Nachteil liegt allerdings darin, dass diese Testsysteme quantitativen Aussagen nur abschätzen lassen.

Zur Bestimmung der biophysikalischen Eigenschaften genutzt, zeigen die weitreichend angewendeten *Xenopus laevis* Oozyten eine Beschränkung in der Expression verschiedener Aquaporine, weiterhin ist die Oozytenqualität variabel und eine temperaturabhängige Messung erweist sich als schwierig.

Diese Nachteile werden durch die Stopped-Flow-Apparatur minimiert und zusätzlich zeichnet sie sich durch weitere Vorteile aus: Die Stopped-Flow-Messung ermöglicht die Detektion verschiedenster Messsysteme, außerdem sind nur geringe Probenmengen, zwischen 50 µl und 1 ml, nötig, es kommt zu einer schnellen Vermischung der Proben und die Probe kann über einen Zeitraum von Millisekunden bis Sekunden untersucht werden.

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des *B. cenocepacia* Aquaglyceroporins, welches durch seine besondere Form des eigentlich hochkonservierten NPA-Motives eine spannende Möglichkeit darbot die Wichtigkeit und die Besonderheiten der Struktur-Funktionsbeziehung dieses Motives genauer zu beleuchten. Durch vorangegangene Arbeiten im Arbeitskreis wurde gezeigt, dass das BccGlpF, wie in der Regel alle bakterielle Aquaglyceroporine, in Oozyten nicht exprimiert werden konnte (Beitz *et al.*, 2004). Somit musste ein anderes Messsystem gefunden werden. Mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur sollten sowohl Messungen mit *E. coli* als auch Messungen mit der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Die Hefe bieten dabei zwei Varianten: Protoplasten und ein noch genaueres System, die sekretorischen Vesikel.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war somit (i) die Herstellung weiterer Mutationen in der NPI und SPA-Region des *Burkholderia cenocepacia* Aquaglyceroporins, (ii) die anschließende biophysikalische Untersuchung der Funktionen dieser veränderten Filterregionen und (iii) die phänotypische Untersuchung mit Methylamin- und Glycerol-Efflux-Assay und dem Ammonium/Ammoniak-Aufnahme-Assay.



## 2 Material

### 2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

#### **AGFA Healthcare, Mortsels, Belgien**

Rapid Fixer G354 und Developer G153 for medical x-ray film processing

#### **Amersham Biosciences, GE Healthcare, München**

Hyperfilme, ECL plus Western Blotting Detektion System, PVDF-Blottingmembran Hybond™-P, Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit

#### **Beckman Coulter, Krefeld**

Ultrazentrifugentubes Centrifuge Bottles Polycarbonate

#### **Becton Dickinson and Company, Heidelberg**

Bacto™ Agar, Bacto™ Tryptone, Bacto™ Peptone, Bacto™ Yeast Extract, Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium

#### **Bio-Rad, München**

Bio-Rad Proteinassay Reagenz

#### **Fermentas, St. Leon-Rot**

dNTPs, Restriktionsendonukleasen mit Reaktions-Puffern, T4-Ligase,  $\lambda$ -DNA

#### **Genaxxon BioScience, Ulm**

Albumin Fraction V, Ampicillin-Natriumsalz, dNTPs, SDS, TEMED, 10x PCR-buffer

#### **Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, UK**

Goat Anti-Mouse IgG-Antikörper

#### **Macherey-Nagel, Düren**

Nucleotrap®, Nucleobond®PC500

#### **Merck, Darmstadt**

APS, Titrisol® Natriumhydroxid, Titrisol® Salzsäure

#### **MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich**

Ethidiumbromidtabletten, Zymolyase 20T, Zymolyase 100T

#### **MWG-Biotech, Ebersberg**

Oligonukleotide, IRD 800-gekoppelte Sequenzierprimer

#### **National Diagnostics, Atlanta, USA**

SequaGel® XR, SequaGel® complete buffer reagent

#### **New England Biolabs, Frankfurt am Main**

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase

### **Oxoid, Basingstoke, USA**

Oxoid-Agar

### **Peqlab Biotechnologie, Erlangen**

peqGold Protein-Marker I, peqGold prestained Protein-Marker III

### **Promega, Mannheim**

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Kit

### **Qiagen, Hilden**

BSA freier muriner RGS-His Antikörper, pQE-30, pQE-80L

### **Roche, Mannheim**

Anti-GFP (Mischung zweier monoklonaler Antikörper aus der Maus), complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Rapid DNA Ligation Kit

### **Roth, Karlsruhe**

Rotiphorese®-Gel40, Roti®-Blue 5x Konzentrat, Rotiphorese® Blau R, alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien

### **Sarstedt, Nürnberg**

Labor-Verbrauchsmaterial (Plastikwaren)

### **Schleicher & Schuell, Dassel**

Whatman Chromatography Paper 3MM

### **Sigma-Aldrich Corporation, München**

APS, DNA-Natriumsalz Typ III von Lachssperma, Ficoll-400, L-Histidin, Lithium-acetat, L-Lysin, Methylaminhydrochlorid, Mineralöl, Polyethylenglycol 3350

### **Stratagene, Waldbronn**

*E. coli* XL 1 Blue MRF<sup>-</sup>-Bakterienzellen

### **Südlaborbedarf, Gauting**

High Yield® PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit

## **2.2 Geräte**

### **Adolf Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen**

Sterilisationsautoclav

### **Avestin Europe GmbH, Mannheim**

LiposoFast

**Bandelin, Berlin**

Ultraschallbad Sonorex RK 514

**Beckman Coulter, Krefeld**

Ultrazentrifuge Optima™ XL-80 K; 50.2 Ti Rotor fixed-angle

**Bio-Rad, München**

Elektroblot Trans-Blot® SD semidry transfer cell; Spannungsquelle für SDS-PAGE Power-Pac 200

**Buch & Holm, Herlev, Dänemark**

Vibrationsviskosimeter SV-10 A&D

**Cawo Photochemisches Werk, Schrobhausen**

Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR; ABS-Kassette

**Clemens, Waldbüttelbrunn**

PCR-Cycler Dualblock Peqlab Primus HT2 und MWG Primus 25 mit HT Manager Software

**Edmund Bühler, Hechingen**

Schüttler KL2

**Eppendorf, Hamburg**

BioPhotometer, Mikrozentrifuge 5415R

**Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel**

Schüttelwasserbad GFL 1083

**Gonotec, Berlin**

Osmomat

**Greiner, Frickenhausen**

Glasgeräte

**Haake-Fisons, Karlsruhe**

Wasserbad Haake D 3

**Heraeus Instruments, Osterode**

Inkubator kelvitron®T B6420, Laborzentrifuge Multifuge 1S-R mit Rotoren 75002006/75002000, Mikrozentrifuge Biofuge pico, Photometer BioPhotometer, Bench Hera Safe Type HS 12

**Herolab, Wiesloch**

UV-Transluminator UVT-20 S/M

**Hewlett-Packart, Böblingen**

Scanjet G4050

### **H+P Labortechnik, Oberschleißheim**

VARIOMAG MONO Magnetrührer

### **IKA-Werke, Staufen**

IKAMAG® RET-GS-Magnetrührer

### **Infors, München**

Inkubatoren Minitron mit integriertem Schüttler

### **Jasco, Gross-Umstadt**

Stopped-Flow BioLogic: Bio-Kine Ver 4.42, Küvette FC-08, Lichtbox mit 150 W Xe(Hg)-Lampe, Microprocessor Unit MPS-60, Mischeinheit SFM-300, Modular UV/Vis-Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator BH-10-61UV, Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250

### **Kers & Sohn, Balingen-Frommern**

Analysenwaage ABS 120-4

### **Labsystems, Vantaa (Finnland)**

Bioscreen C

### **Landgraf Laborsystem, Langenhagen**

Homogenistaor Tissue Grindler Pestle 7 ml und Tube 7 ml

### **LI-COR Biosciences, Bad Homburg**

Sequenzierer LI-COR DNA Sequencer Model 4200, BaselmagIR V.4.2. Software

### **Malvern Instruments GmbH, Herrenberg**

Zetasizer Nano ZS

### **Mettler-Toledo, Giessen**

Pipetten RAININ Classic™

### **New Brunswick Scientific, Wesseling-Berzdorf**

Tiefkühlschrank Innova U535

### **Peqlab, Erlangen**

SDS-PAGE-Kammer PerfectBlue® vertikales Doppelgelsystem Twin S

### **Pharmacia Biotech, Freiburg**

Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese Elektrophoresis Power Supply EPS-300

### **Raytest, Straubenhardt**

Gel-Dokumentations-System Raytest IDA

### **Savant Instruments, Farmingdale, USA**

Vakuumzentrifuge DNA Speedvac® DNA110

**SCHOTT Instruments, Mainz**

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

**Scientific Industries, New York, USA**

Vortex Genie 2

**SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation, Barsbüttel**

Reinstwasseranlage

**Thermo-Dux, Wertheim**

Heizblock Techne Dri-Block® DB-2D

**Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA**

Hochdruck-Homogenisator French Press cell disrupter FA-078 mit French Press Zelle FA-032

**WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen**

Brutschrank, Heißluftsterilisator

## 2.3 Oligonukleotide (Primer)

**Sequenzierprimer**

Die Sequenzierprimer waren alle am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD 800 markiert.

Name	DNA-Sequenz (5' - 3')	Position
pDR196		
PMA-Primer (sense)	CTC TCT TTT ATA CAC ACA TTC	725 - 745
ADH-Primer (antisense)	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC	1030 - 1050
pUG36		
MET25-Primer (sense)	AGT AAA GCG TCT GTT AGA AAG G	3049 - 3070
GFP-Primer (sense)	CGA AAA GAG AGA CCA CAT G	3817 - 3835
CYC1-Primer (antisense)	ATA GGG ACC TAG ACT TCA G	4046 - 4064
pQE-30 / pQE-80L		
pQE sense	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	71 - 88
pQE antisense	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G	225 - 243

### Mutageneseprimer

Die veränderten Nukleotide zur Einführung von Mutationen sind fett und unterstrichen dargestellt.

Name	DNA-Sequenz (5' - 3')	Position
Bcc N64A sense	AGC GGC GCG CAC CTG <u><b>GCC</b></u> CCG ATC	175 - 207
Bcc N64A antisense	AT CGT GAC GAT CGG <u><b>GGC</b></u> CAG GTG	206 - 174
	CGC GCC GCT G	
Bcc N64D sense	AGC GGC GCG CAC CTG <u><b>GAC</b></u> CCG ATC	175 - 207
Bcc N64D antisense	AT CGT GAC GAT CGG <u><b>GTG</b></u> CAG GTG	206 - 174
	CGC GCC GCT G	
Bcc S186A sense	ACC GGC TAT GCG ATG <u><b>GCC</b></u> CCC GCG	541 - 573
Bcc S186A antisense	AG GTC GCG CGC GGG <u><b>GGC</b></u> CAT CGC	572 - 540
	ATA GCC GGT C	
Bcc S186C sense	ACC GGC TAT GCG ATG <u><b>TGC</b></u> CCC GCG	541 - 573
Bcc S186C antisense	AG GTC GCG CGC GGG <u><b>GCA</b></u> CAT CGC	572 - 540
	ATA GCC GGT C	
Bcc S186D sense	ACC GGC TAT GCG ATG <u><b>GAC</b></u> CCC GCG	541 - 573
Bcc S186D antisense	AG GTC GCG CGC GGG <u><b>GTC</b></u> CAT CGC	572 - 540
	ATA GCC GGT C	
Bcc S186T sense	ACC GGC TAT GCG ATG <u><b>ACC</b></u> CCC GCG	541 - 573
Bcc S186T antisense	AG GTC GCG CGC GGG <u><b>GGT</b></u> CAT CGC	572 - 540
	ATA GCC GGT C	

Bcc R189V sense	CCC GCG <u><b>GTC</b></u> GAC CTG TCG CCG CGC ATC ATG CAT	559 - 591
Bcc R189V antisense	ATG CAT GAT GCG CGG CGA CAG GTC <u><b>GAC</b></u> CGC GGG	591 - 559

### Klonierungsprimer

Die Schnittstellen sind fett und unterstrichen dargestellt.

Name	DNA-Sequenz(5' - 3')	Position
pDR196HA ( <i>Spe</i> I)	<u><b>CT AGT</b></u> ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCT GAC TAT GCG CTG CA	(-51) - (-17)
pDR196HA ( <i>Pst</i> I)	<u><b>G</b></u> CGC ATA GTC AGG AAC ATC GTA TGG GTA CAT A	(-13) - (-47)

## 2.4 DNA-Sequenz

Die DNA des putativen Aquaglyceroporins lag bereits im Arbeitskreis vor. Es wurde genomische DNA des *Burkholderia cenocepacia* bezogen und daraus das BccGlpF Aquaglyceroporin kloniert. Das putative Aquaglyceroporin wurde BccGlpF genannt, und als BccGlpF befand es sich im Vektor pDR196.

Die Aminosäure- und Proteinsequenz ist im Anhang unter 9.1, DNA- und Proteinsequenz vom BccGlpF, aufgeführt.

## 2.5 Verwendete Plasmide

Plasmide für *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli*

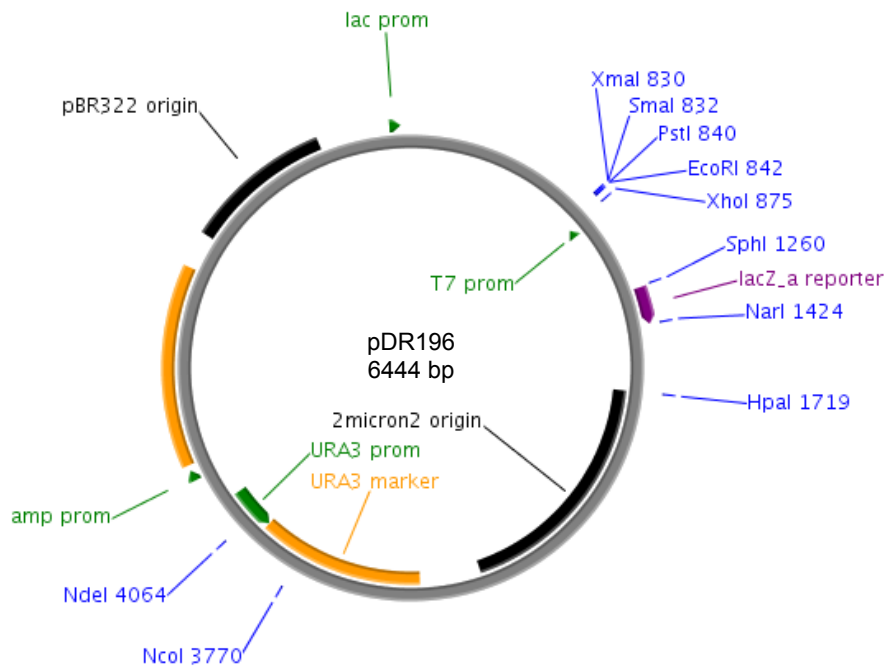


Abbildung 2.1: pDR196

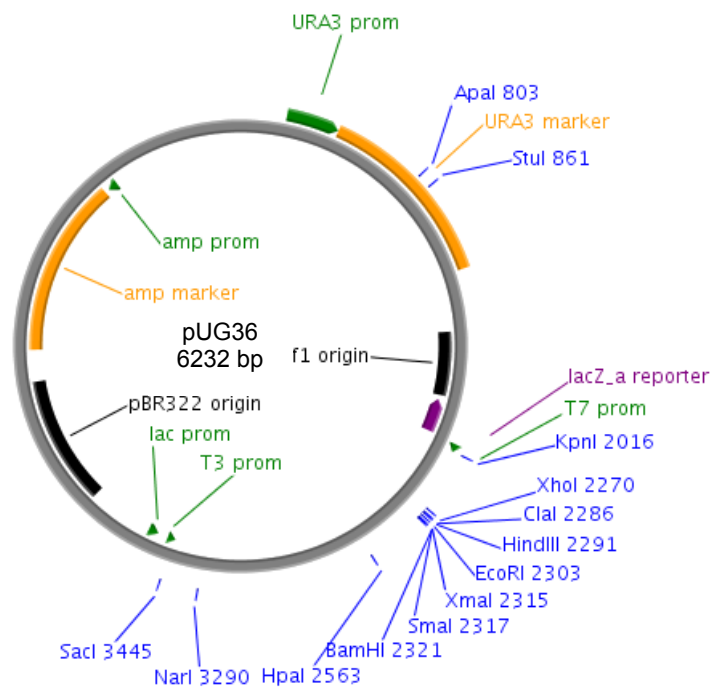


Abbildung 2.2: pUG36



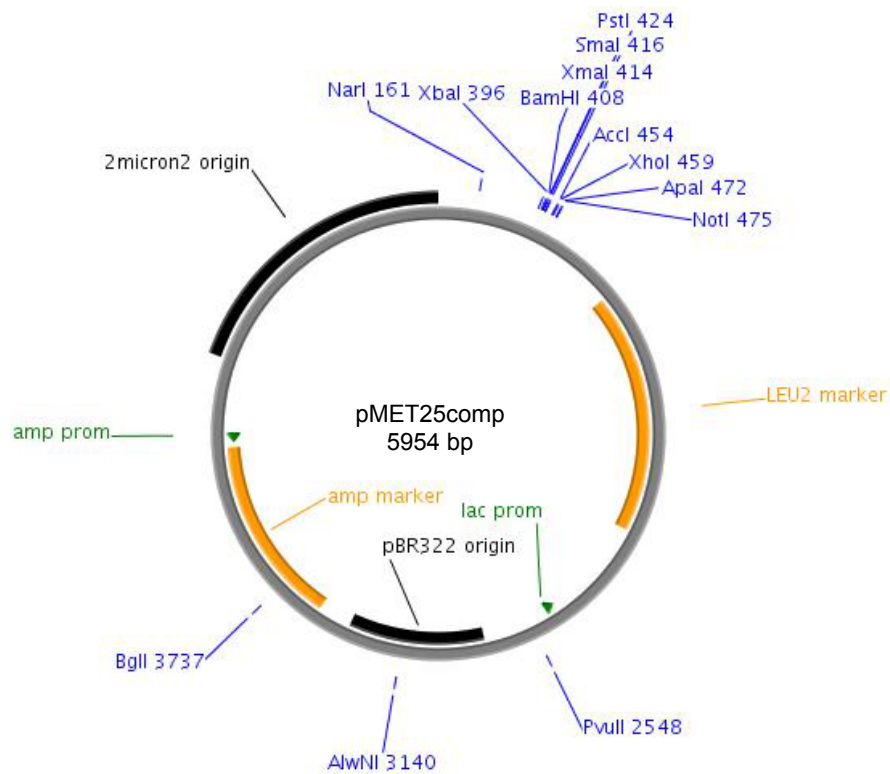


Abbildung 2.3: pMET25comp

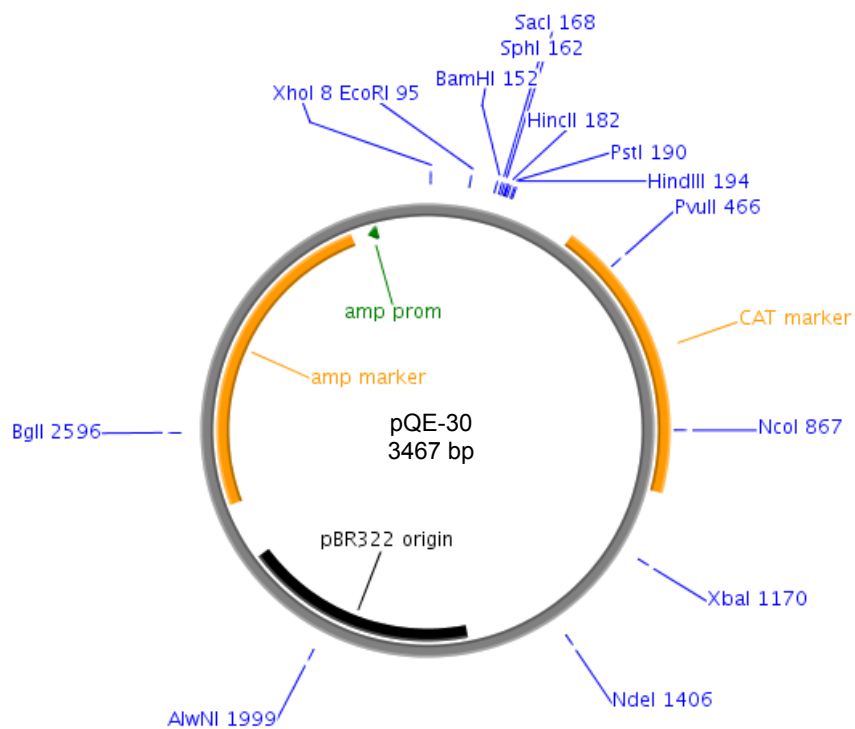
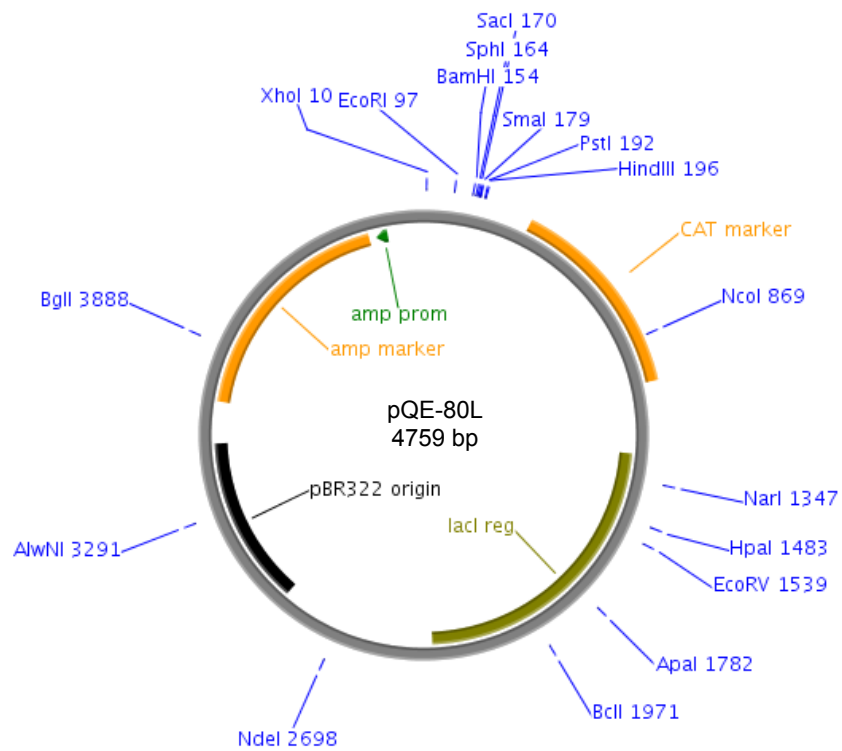
Plasmide für *Escherichia coli*

Abbildung 2.4: pQE-30



**Abbildung 2.5:** *pQE-80L*

## 2.6 Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* - Stämme

BY4742	( <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> ) von Euroscarf
BY4742 $\Delta$ fps1	( <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>his3<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> , <i>lys2<math>\Delta</math>0</i> , <i>ura3<math>\Delta</math>0</i> , <i>fps::KanMX4</i> ) von Euroscarf
31019 $\Delta$ fps1	( <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3</i> , <i>mep1<math>\Delta</math>mep2<math>\Delta</math>::LEU</i> , <i>mep3<math>\Delta</math>::KanMX2</i> ; <i>fps1<math>\Delta</math>0</i> ) vom Arbeitskreis Prof. Beitz
NY17	( <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>sec6-4</i> ) Salminen & Novick, 1987

## 2.7 Verwendete *Escherichia coli* - Stämme

DH5	F <sup>-</sup> $\phi$ 80/ <i>lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)</i> <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math>-</i> Hanahan, 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sub>r</sub>)</i> ] von Stratagene
MM294	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17 supE44(AS) rfbD1 spoT1 thi-1</i> Meselson & Yuan, 1968
SK46	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17 supE44(AS) rfbD1 spoT1 thi-1 aqpZ<math>\Delta</math>::Kan, glpF<math>\Delta</math>::Sm</i> Calamita et al., 1998

### 2.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar). Für Verdünnungen wurde autoklaviertes Wasser verwendet, welches über Umkehrosmose, Filtration und anschließendes Autoklavieren gereinigt wurde.

#### Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden:

##### Agarose-Gelelektrophorese von DNA

###### 50x TAE-Puffer

2 M Tris/Acetat pH 8,0  
50 mM EDTA

###### 10x Probenpuffer orange

0,4% orange G  
30% Glycerol  
100 mM EDTA

###### Ethidiumbromid-Lösung

1 Tablette Ethidiumbromid  
10 ml Aqua bidest.  
lichtgeschützt bei 4°C lagern

##### *E. coli*-Nährmedien

###### LB-Medium

10 g/l Trypton  
10 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt

###### LB-Medium mit Antibiotika

100 µg/ml Ampicillin  
50 µg/ml Kanamycin  
50 µg/ml Streptomycin

###### LB-Plattenagar

15 g/l Agar  
in LB-Medium

###### LB-Plattenagar mit Antibiotika

100 µg/ml Ampicillin  
50 µg/ml Kanamycin  
50 µg/ml Streptomycin

###### LB-Agar (Lennox)

35 g/l LB-Agar Lennox

**M9-Medium**

8,54 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
3 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
0,5 g/l	$\text{NaCl}$
1 g/l	$\text{NH}_4\text{Cl}$
2 g/l	Casein
4 g/l	Glucose
2 ml/l	1 M $\text{MgSO}_4$
100 $\mu\text{l/l}$	1 M $\text{CaCl}_2$
20 ml/l	0,5 M Maltose

***Saccharomyces cerevisiae*-Nährmedien****YPD-Medium**

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton
20 g/l	Glucose

**YPD-Agarplatten**

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton
20 g/l	Glucose
20 g/l	Oxoid-Agar

**SD-Medium**

1,7 g/l	YNB
5 g/l	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20 g/l	Glucose
mit NaOH auf pH 5,6	

**SD HLK-Medium**

nach dem Autoklavieren zu SD-Medium  
hinzugeben:

1 ml/l	Histidin (20 mg/ml)
5 ml/l	Leucin (25 mg/ml)
1 ml/l	Lysin (20 mg/ml)

**SD-Agarplatten**

1,7 g/l	YNB
5 g/l	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20 g/l	Glucose
mit NaOH auf pH 5,6	

**SD HLK-Agarplatten**

nach dem Autoklavieren zu SD-Agar-  
platten hinzugeben:

1 ml/l	Histidin (20 mg/ml)
5 ml/l	Leucin (25 mg/ml)
1 ml/l	Lysin (20 mg/ml)

## 2 Material

---

### NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Aufnahmeassay

5x YNB	
8,5 g/l	YNB
5x Glucose	
150 g/l	Glucose

### Ammonium-Medium (Bioscreen)

40 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
40 mM	MOPS
1,7 g/l	YNB
20 g/l	Glucose
mit NaOH auf pH 6.9	

### Transformation von *Escherichia coli*

#### 1,5x LB

15 g/l	Trypton
15 g/l	NaCl
7,5 g/l	Hefeextrakt
10 mM	PIPES, pH 6,5

#### TSS

15 ml	1,5x LB
4 ml	PEG (MW3350) 50%
0,4 ml	MgCl <sub>2</sub>
1 ml	DMSO

#### 10x CM-Lösung

100 mM	CaCl <sub>2</sub>
100 mM	MgCl <sub>2</sub>

### Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

#### Lithiumacetatlösung 1 M

1 M	Lithiumacetat
-----	---------------

#### PEG-Lösung 50%

50%	PEG (MW3350)
-----	--------------

#### TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA

#### Single stranded-carrier DNA (2 mg/ml)

200 mg	in 100 ml TE-Puffer
--------	---------------------

**DNA-Sequenzierung**

## 10x TBE-Puffer

0,89 M Tris  
 0,89 M Borsäure  
 0,02 M Na<sub>2</sub>EDTA  
 mit NaOH auf pH 8,3

**Puffer und Lösungen für proteinchemische Methoden:****Präparation der Membranproteine**

## Extraktionspuffer

25 mM Tris·HCl, pH 7,5  
 5 mM EDTA

## 25x Proteaseinhibitor

1 Tablette Proteaseinhibitor  
 2 ml Aqua bidest.

## PBS-Puffer

137 mM NaCl  
 2,7 mM KCl  
 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 mit HCl auf pH 7,4

## 10x TBS-Puffer

7,7 mM Tris·HCl, pH 7,6  
 150 mM NaCl

**SDS-Gelelektrophorese**

## 4x SDS-Ladepuffer

1 M Tris·HCl pH 6,8  
 400 mM 1,4-Dithiothreitol  
 8% SDS  
 0,02% Bromphenolblau  
 40% Glycerol

## 10x Kathodenpuffer

0,25 M Tris·HCl, pH 8,3  
 1,92 M Glycin  
 1% SDS

## 2 Material

---

### 4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris·HCl, pH 6,8  
0,4% SDS

### 4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris·HCl, pH 8,8  
0,4% SDS

### Ponceau S-Färbelösung

1% Ponceau S  
3% Essigsäure

### SDS-Gel-Färbelösung

20 ml 5x Roti®-Blue  
20 ml Methanol  
60 ml Aqua bidest

## Protein-Elektroblotting

### 5x Transferpuffer

25 mM Tris·HCl, pH 8,3  
192 mM Glycin  
0,0375% SDS

### 1x Transferpuffer

10 ml 5x Transferpuffer  
10 ml Methanol  
30 ml Aqua bidest.

## Western Blotting

### 10x TBS-Puffer

1,35 M NaCl  
0,2 M Tris·HCl, pH 7,6

### TBS-T-Puffer

100 ml/l 10x TBS-Puffer  
1 ml/l Tween 20

### M-TBS-T-Puffer

3 g Milchpulver  
ad 100 ml TBS-T-Puffer



**primärer Antikörper**

RGS-His Antikörper

Verdünnung

monoklonaler Antikörper

0,02 µg/ml M-TBS-T-Puffer

GFP-Antikörper

Mischung von zwei monoklonalen  
Antikörpern

0,04 µg/ml M-TBS-T-Puffer

HA-Antikörper

monoklonaler Antikörper

0,08 µg/ml M-TBS-T-Puffer

rAQP1-Antikörper

monoklonaler Antikörper

0,2 µg/ml M-TBS-T-Puffer

**sekundärer Antikörper**Ziege-anti-Maus, konjugiert mit  
Meerrettich Peroxidase

Verdünnung je nach Primärantikörper:

polyklonaler Antikörper

RGS-His Antikörper

0,008 µg/ml M-TBS-T-Puffer

GFP-Antikörper

0,04 µg/ml M-TBS-T-Puffer

HA-Antikörper

0,08 µg/ml M-TBS-T-Puffer

rAQP1-Antikörper

0,2 µg/ml M-TBS-T-Puffer

### Medium zur Protoplastierung von *Saccharomyces cerevisiae*

#### Puffer I (Inkubationspuffer)

50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
mit KOH auf pH 7,2  
0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
(nach dem Autoklavieren hinzufügen)

#### Puffer II (Protoplastierungspuffer)

2,4 M Sorbitol  
50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
mit KOH auf pH 7,2  
0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
(nach dem Autoklavieren hinzufügen)

#### Puffer III

1,8 M Sorbitol  
50 mM NaCl  
5 mM  $\text{CaCl}_2$   
10 mM Tris-HCl, pH 7

#### Puffer IV

1,2 M Sorbitol  
50 mM NaCl  
5 mM  $\text{CaCl}_2$   
10 mM Tris-HCl, pH 7

### Vesikelpräparation

#### Protoplastenmedium

1,4 M Sorbitol  
50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
mit KOH auf pH 7,2  
0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
(nach dem Autoklavieren hinzufügen)

#### Concanavalin A-Lösung

25 mg/ml Concanavalin A  
1 mM  $\text{MnCl}_2$   
1 mM  $\text{CaCl}_2$   
in 1 Teil Puffer I + 2 Teile Puffer II

#### Lysepuffer

0.8 M Sorbitol  
10 mM Triethanolamin  
1 mM EDTA  
mit HCl auf pH 7,2

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 PCR-Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde zum Einfügen von Mutationen genutzt. Dazu wurden spezifische Primer verwendet.

Die Primer-Anlagerungstemperatur wurde dabei näherungsweise nach folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{Annealing}} [^{\circ}\text{C}] = 60 + 0,41 * \%GC - 600/N$$

Dabei ist %GC der GC-Gehalt in Prozent und N die Anzahl der Basen im Primer.

Die Extensionszeit  $t_{\text{ex}}$  in [s] konnte berechnet werden nach folgender Formel:

$$t_{\text{ex}} [\text{s}] = 0,06 * \text{Länge des erwarteten Produkts} [\text{bp}]$$

Sie betrug jedoch mindestens 1 min.

#### 3.1.2 Isolierung und Reinigung von DNA

##### Miniprep- DNA-Isolierung aus *E. coli*

Einzelklone oder eine bereits existierende Dauerkultur wurden in 6 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums überführt und über Nacht (10 - 16 h) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde bei 13.000 x g für 5 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet für die Plasmidpräparation verwendet. Zur Isolierung und Aufreinigung der Plasmide wurde das Wizard-Plus-Purification-Kit® entsprechend der Herstellervorschrift verwendet. Abwandlungen von der Herstellervorschrift waren das Verzichten der Zugabe der alkalische Protease und die Eluierung der isolierten Plasmid-DNA mit lediglich 50 µl Wasser, statt der angegebenen 100 µl.

##### Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden entweder mit dem Peqlab-Kit®, mit dem Nucleotrap®-Kit oder mit dem Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit entsprechend der

Herstellerangaben aus Agarosegelen extrahiert. Zur Elution wurde zwischen 15 und 30 µl Wasser eingesetzt.

Wenn eine Aufkonzentrierung von Nöten war, wurde diese mit der SpeedVac® durchgeführt.

#### **PCR-Produkt-Aufreinigung**

Mit den drei soeben genannten Kits konnten auch die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Die Durchführung war wiederum entsprechend der Herstellerangaben.

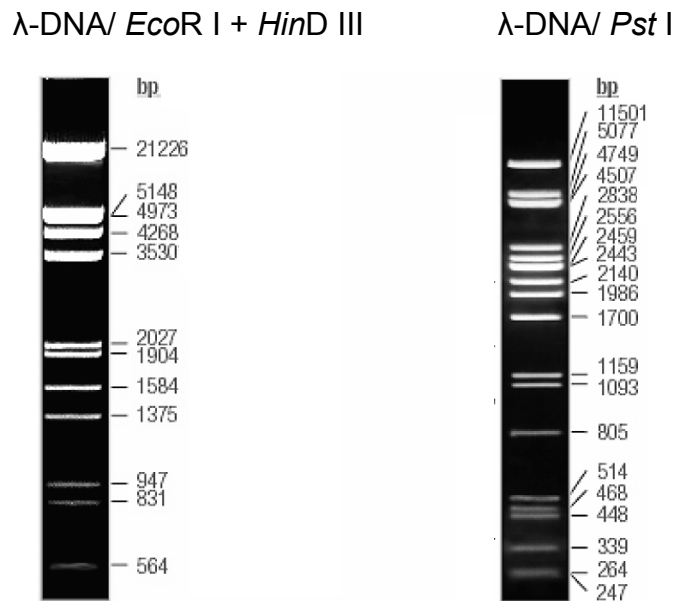
### **3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde die Konzentration der Agarose im Gel gewählt. Wobei folgendes galt: Fragmentgröße größer als 800 bp ein Gel mit 1% Agarose; 500 bis 1000 bp ein Gel mit 2% Agarose und bei kleineren Fragmenten unter 500 bp ein Gel mit 4% Agarose.

Die gewünschte Agarosemenge wurde abgewogen, mit 1 ml 50x TAE-Puffer versetzt und auf 50 ml Wasser aufgefüllt. Diese Mischung wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose geschmolzen war, anschließend mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in die schon vorbereiteten Gelgießvorrichtung gegeben. Nach der Aushärtung des Gels, ca. 20 min, konnte das Gel mit den jeweiligen Proben beladen werden. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

Zur Größenabschätzung wurden zwei verschiedene Marker genutzt: die mit *EcoR* I/*HinD* III-verdaute λ-DNA oder die mit *Pst* I-verdaute λ-DNA (siehe Abbildung 3.1).

Die DNA-Proben wurden mit ca. 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt und bei 100 - 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion wurde das Gel bei UV-Licht mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 360$  nm betrachtet.



**Abbildung 3.1:** *EcoR* I/*Hind* III verdaute  $\lambda$ -DNA und *Pst* I verdaute  $\lambda$ -DNA als Größenmarker für DNA-Gelelektrophorese (Quelle: Produktkatalog Fermentas).

### 3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch bei  $\lambda = 260$  nm bestimmt. Mit folgender Formel konnte die Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  berechnet werden:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260 \text{ nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung}$$

$f = 0,02$  bei Oligonukleotiden, Einzelstrang-DNA

$f = 0,04$  bei Plasmiden, Doppelstrang-DNA

Zusätzlich wurde bei  $\lambda = 280$  nm auf Proteinanwesenheit geprüft. Wenn das Verhältnis von  $E_{260 \text{ nm}}/E_{280 \text{ nm}}$  über 1,8 lag, konnte man davon ausgehen, dass die DNA ausreichend rein war.

Für die Konzentrationsbestimmung bei Minipreps konnte man also bei einer Verdünnung von 4  $\mu\text{l}$  Miniprep ad 100  $\mu\text{l}$  Wasser direkt die Konzentration aus der Absorption ablesen.

### **Konzentrationsbestimmung mittels Abschätzung**

Die Konzentration von Nukleinsäuren konnte auch bei Betrachtung des mit Ethidiumbromid angefärbten Gels über den Vergleich der Intensität der Banden und Bandengröße mit denen der Größenmarker abgeschätzt werden.

### **3.1.5 Restriktionsverdau von DNA**

Üblicherweise wurde der Verdau mit Endonukleasen in 10 µl-Ansätzen durchgeführt. Wobei die entsprechende DNA-Menge mit 1 U Enzym/µg DNA mindestens eine Stunde bei der dafür vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert wurde. Bei dem Einsatz mehrere Enzyme und unterschiedlichen empfohlenen Puffern wurde wenn möglich in einem für alle eingesetzten Enzyme kompatiblen Puffer inkubiert.

### **3.1.6 Ligation**

Die PCR-Produkte, die Plasmid-DNA sowie die jeweiligen Vektoren wurden mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt, anschließend aufgereinigt und die Konzentration über ein Agarosegel oder photometrisch abgeschätzt.

Für eine effiziente Ligation entsprach das molare Verhältnis zwischen Vektor und dem Insert einem Verhältnis von 1 : 3. Es wurde in einem Ligationsansatz von 10 µl gearbeitet. Die Ligationszeit betrug 1 - 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur.

### **3.1.7 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen**

XL Blue *E. coli* Zellen wurden auf einer LB-Agarplatte, welche Tetracyclin enthielt, ausgestrichen. DH5α *E. coli* Zellen wurden auf antibiotikafreien LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen: CaCl<sub>2</sub>-Methode (nach Cohen *et al.*, 1972)**

Am nächsten Morgen wurde jeweils eine einzelne Kolonie in 6 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums überführt und bei 37°C und 180 U/min weiter inkubiert. Am Abend konnte die 6 ml-Vorkultur in 100 ml LB-Medium, das je

nach *E. coli*-Stamm antibiotikahaltig oder -frei war, gegeben werden und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert werden. Am darauffolgenden Morgen sollte eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 zu messen sein, leicht abweichende optische Dichten wurden auch noch akzeptiert (0,4 - 0,6). Diese Bakteriensuspension wurde in zwei Falcon Tubes aufgeteilt und für mindestens 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2 000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet jeweils 15 ml eiskalte 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben, 10 min auf Eis gehalten, anschließend vorsichtig durch leichtes Schütteln resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gehalten. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert (2 000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis gehalten. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2 000 x g, 4°C und 10 min. Der Überstand wurde verworfen, und in beide Falcon Tubes jeweils 5 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung inklusive 20% Glycerol zu dem Pellet gegeben und unter leichtem Schütteln resuspendiert. Die beiden Lösungen wurden in einem Falcon Tube vereinigt. Die Mischung für mindestens 4 h auf Eis gelegt, alternativ konnte die Suspension auch die ganze Nacht auf Eis gehalten werden. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl Aliquots bei -20°C vorgekühlt und dann zur abschließenden Lagerung bei -80°C gegeben.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen auf die PEG-DMSO-Methode umgestellt. Der Vorteil bei gleicher Qualität lag in einer schnelleren und einfacheren Herstellung.

#### **Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen: TSS-Methode (nach Chung *et al.*, 1989)**

Am Abend wurde jeweils eine einzelne Kolonie in 6 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums überführt und bei 37°C und 180 U/min über Nacht inkubiert. 1 ml der über-Nacht-Kultur wurde in 100 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,3 bis 0,4 weiter unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde in zwei Falcon Tubes gegeben und für mindestens 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (2 000 x g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 5 ml eiskalter TSS-Lösung aufgenommen, vorsichtig durch leichtes Schütteln resuspendiert und vereinigt. Erneut wurde die Suspension zentrifugiert (2 000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und

für 10 min auf Eis gehalten. Die Lösung wurde zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **Standardtransformation von *E. coli* Zellen: CaCl<sub>2</sub>-Methode**

Der Ligationsansatz wurde mit 10 µl 10x CM-Lösung gemischt und auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt, zu den gerade aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis gehalten. Anschließend für 1 min bei 42°C inkubiert und nochmals für 10 min auf Eis gehalten. Es wurden 600 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gesammelt (13 000 x g, 15 s), 600 µl des Überstandes verworfen und der Rückstand in den verbliebenen 100 µl resuspendiert. Diese Mischung wurde dann auf LB-Agarplatten mit dem selektiven Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **Standardtransformation von *E. coli* Zellen: PEG-DMSO-Methode**

Der Ligationsansatz konnte direkt zu den gerade aufgetauten kompetenten Zellen gegeben werden. Die anschließende Prozedur ist analog zu der obigen CaCl<sub>2</sub>-Methode.

#### **Schnelltransformation von *E. coli* Zellen**

Eine Schnelltransformation war möglich, wenn lediglich eine bereits vorhandene Plasmid-DNA transformiert werden sollte.

Dazu wurde 1 µl DNA auf die gerade aufgetauten kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 15 min auf Eis gehalten. Anschließend für 1 min bei 42°C erwärmt und diese Lösung direkt auf die antibiotikahaltige LB-Agarplatte gestrichen. Die LB-Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.8 *E. coli* - Dauerkulturen**

Zum Animpfen von Expressionskulturen und zur Lagerung von Plasmiden wurden Dauerkulturen angelegt.

1 ml einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur wurde mit 500 µl 80%igem Glycerol versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren.



Durch den Zusatz von Glycerol wird ein langsames Kristallwachstum bewirkt, so dass die Zellen durch dieses nicht zerstört werden.

Bei Bedarf wurde etwas Zellmaterial von der Oberfläche abgekratzt und in 6 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert.

### 3.1.9 Klonierungsarbeiten

Die verschiedenen BccGlpF-Mutanten wurden durch die in vitro Mutagenese-Methode nach dem Protokoll QuickChange® Site-Directed Mutagenesis der Firma Stratagene hergestellt. Ausgehend vom pDR196 BccGlpF wurden die Mutationen mit Hilfe der entsprechenden Primern eingeführt (Primer siehe 2.3).

Dazu wurde nach dem folgenden Pipettierschema Tabelle 3.1 vorgegangen:

0,4 µl	Plasmid-DNA (200 ng/µl)
5 µl	10x Pfu Puffer
4 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
1,5 µl	sense-Primer (25 µM)
1,5 µl	antisense-Primer (25 µM)
0,8 µl	Pfu Turbo® DNA-Polymerase
ad 50 µl	Wasser

**Tabelle 3.1:** *Pipettierschema für die Einführung von Mutationen.*

Und für die PCR-Reaktion wurde das folgende PCR-Programm Tabelle 3.2 durchlaufen:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	30 s
12 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Primer-Anlagerung	55°C	60 s
Extension	68°C	~60 s
Extension	68°C	20 min
Kühlung bis zur weiteren Verarbeitung	4°C	∞

**Tabelle 3.2:** PCR-Programm für die Einführung von Mutationen.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde zu dem Reaktionsansatz *Dpn* I hinzugegeben und über Nacht bei 37°C verdaut. Dabei schneidet *Dpn* I die methylierte Mutterstrang-DNA, so dass das neue Plasmidprodukt, inklusive der neuen Mutation, über ein Agarosegel von dieser getrennt werden konnte. Das gereinigte PCR-Produkt wurde für die Transformation von *E. coli* genutzt. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurde die eingeführte Mutation mit Hilfe der DNA-Sequenzierung überprüft.

Die Umklonierung des BccGlpF Wildtyps in die Vektoren pQE-30 und pQE-80L fand statt durch einen Verdau mit den beiden Enzymen *Bam*H I und *Hin*D III. Es konnten sowohl die beiden Vektoren pQE-30 und pQE-80L als auch pDR196 BccGlpF zur Gewinnung des BccGlpF mit den genannten Enzymen verdaut werden und die aufgereinigten DNA-Stücke ligiert werden.

Auch für die Umklonierung der BccGlpF-Mutanten ausgehend von pDR196 inklusive der BccGlpF-Mutanten, in den Vektor pUG36 konnten die zwei Enzyme *Bam*H I und *Hin*D III genutzt werden.

Für die Erweiterung des Vektors pDR196 inklusive aller BccGlpF-Mutanten mit einem HA-Tag wurde der Vektor mit *Spe* I und *Pst* I geschnitten und der HA-Tag, welcher

die gleichen Schnittstellen besaß, ligiert. Eine Vorkontrolle der erfolgreichen Klonierung war leicht durch die deletierte *Bam*H I-Schnittstelle möglich. Die zwei pDR196HA Klonierungsprimer, pDR196HA (*Spe* I) und pDR196HA (*Pst* I) wurden gemischt, 5 min auf 95°C erwärmt und im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt. Der erhaltene Doppelstrang wurde wie folgt mit den BccGlpF-Mutanten, die sich im pDR196 befanden, ligiert.

7 µl	aufgereinigte Plasmid-DNA ( <i>Spe</i> I & <i>Pst</i> I geschnitten)
1 µl	HA-Tag-Mischung (je 25 µM)
1 µl	10x T4-Ligase Puffer
1 µl	T4-Ligase

**Tabelle 3.3:** Pipettierschema für die Einführung des HA-Tag.

*E. coli* GlpF wurden aus dem Vektor pRS426 mit *Spe* I und *Xho* I herausgeschnitten und in den ebenso mit *Spe* I und *Xho* I geschnittenen Vektor pDR196 kloniert.

Die Klonierung des rAQP1 in pMET25comp erfolgte durch die Enzyme *Bam*H I und *Sal* I, das rAQP1 wurde dabei aus dem pRS426 rAQP1 mit den zwei genannten Enzymen herausgeschnitten.

Die letztendliche Kontrolle der jeweiligen Klonierungskonstrukte erfolgte durch eine anschließende DNA-Sequenzierung.

### 3.1.10 DNA - Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode unter Verwendung von ddNTPs sequenziert. Die Probenvorbereitung für die Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des Thermo Sequenase<sup>TM</sup> Primer Cycle Sequencing Kits.

Es wurde ein Mastermix hergestellt mit 1 - 2 pmol DNA, 1 µl Fluoreszenz-markierter Primer und mit Wasser zu einem Endvolumen von 13 µl aufgefüllt. In PCR-Cups wurden je 1,5 µl der ddNTPs/dNTPs-Mischung vorgelegt und mit je 3 µl des Mastermixes versetzt, diese Reaktionsansätze wurden mit einem Tropfen Mineral Oil überschichtet und in den Thermocycler gesetzt.

Für die Amplifikation wurde das folgende Cycler-Programm verwendet.

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	120 s
20 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Primer-Anlagerung	55°C	30 s
Extension	72°C	60 s
Kühlung bis zur weiteren Verarbeitung	4°C	∞

**Tabelle 3.4:** *PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung.*

Die PCR-Ansätze zur DNA-Sequenzierung wurden mit 5 µl Formamid-Puffer versetzt und von dieser Mischung jeweils 1 µl auf ein 6%iges Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte mittels des Licor DNA Sequencers 4200 bei 1 500 V, als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit der BaselmagIR V 4.2. Software.

30 ml	SequaGel XR 7,5%
7,5 ml	SequaGel Complete buffer reagent
400 µl	DMSO
300 µl	10% APS

**Tabelle 3.5:** *Zusammensetzung des 6%igen Polyacrylamidgels.*

### 3.1.11 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Zum Animpfen von Expressionskulturen und zur Lagerung von transformierten Hefen wurden Dauerkulturen angelegt.

560 µl einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur wurde mit 940 µl 80%igem Glycerol versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren.

Bei Bedarf wurde etwas Zellmaterial von der Oberfläche abgekratzt und in entsprechendes Selektionsmedium gegeben.

### 3.1.12 Transformation von *S. cerevisiae*

Ein Klon des zu transformierenden Hefestamms wurde in 10 ml YPD-Medium überführt und über Nacht bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und die Mischung mit YPD in einem neuen Kolben auf eine optische Dichte von 0,2 verdünnt, wobei hier 50 ml des Ansatzes für 10 Hefe-Transformationen ausreichten. Die Hefesuspension wurde erneut bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert, bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von ~0,6. Danach wurde der Ansatz in Falcon Tubes überführt und zentrifugiert (2 500 x g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand mit 25 ml und 1 ml Wasser gewaschen (2 500 x g, 4°C, 5 min). Im Anschluss wurde das Pellet erneut in 1 ml Wasser aufgenommen und auf 10 Eppendorfgefäße verteilt. Nun wurden die Eppendorfgefäße zentrifugiert (2 500 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand verworfen. Zu dem jeweiligen Pellet wurden 240 µl PEG 3500 50%, 36 µl 1 M Lithiumacetat-Lösung, 50 µl single-stranded-carrier DNA (5 min im Heizblock gekocht und bis zum Gebrauch auf Eis gehalten), 33,5 µl Wasser und 0,5 µl Plasmid-DNA gegeben. Im Anschluss wurde der Ansatz solange gevortext, bis das Pellet vollständig suspendiert vorlag. Die Mischung wurde 60 min bei 42°C erwärmt, anschließend zentrifugiert (13 000 x g, 20 s) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde wiederum in 500 µl Wasser aufgenommen und von dieser Mischung 120 µl auf SD HLK-Agarplatten ausplattiert.

Die SD HLK-Agarplatten wurde inkubiert bei 29°C für 3 bis 4 Tage.

### 3.1.13 Cotransformation von *S. cerevisiae*

Bei der Hefe-Cotransformation wurden zwei verschiedene Plasmide in die Hefe eingebracht. Hierfür war nur eine Hefe verwendbar, die auch zwei Selektionsmarker besitzt. Im Falle dieser Arbeit wurde BY4742Δfps1 verwendet; sie besitzt neben einem ura3-Selektionsmarker auch einen leu2-Selektionsmarker.

Für die Cotransformation wurde analog der Hefetransformation verfahren.

Es wurden pDR196 mit ura3 und pMET25comp mit leu2-Selektionsmarker eingesetzt.

### 3.2 Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1 Präparation der Membranproteine aus *S. cerevisiae*

Zur Expressionskontrolle in *S. cerevisiae* wurde die Totalmembranfraktion der transformierten Hefen isoliert.

##### **Probenaufbereitung der Membranproteine aus *S. cerevisiae***

Von den SD HLK-Platten der transformierten Hefe wurde jeweils eine Kolonie in ca. 10 ml SD HLK-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dieser Hefeansatz mit 90 ml SD HLK-Flüssigmedium aufgefüllt und eine weitere Nacht inkubiert, bei 29°C und 180 U/min. Bei einer OD<sub>600</sub> von mindestens 1,5 wurde der Ansatz abzentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Hefepellet wurde mit 25 ml in Eis gekühltem Wasser aufgenommen, erneut zentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand verworfen. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift an mit 5 - 10 ml ebenfalls auf Eis gekühltem Extraktionspuffer (zentrifugieren bei 2 200 x g, 4°C, 5 min und Verwerfen des Überstandes). Das so erhaltene Pellet wurde in 500 µl eiskaltem Extraktionspuffer, inklusive Proteaseinhibitor, aufgenommen und mit ca. 0,5 g Säure-gewaschenen Glasperlen versetzt. Die Mischung wurde zehnmal für 30 s durch Vortexen aufgeschlossen, wobei zwischen jedem Vortexschritt die Probe für mindestens 1 min auf Eis gekühlt wurde. Der milchige Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (1 000 x g, 4°C, 5 min). Der immer noch milchige Überstand wurde nun in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (100 000 x g, 4°C, 45 min). Durch diesen Zentrifugationsschritt wurde die Membranproteinfraktion, nun im Rückstand, von der löslichen Proteinfraktion, dem Überstand, getrennt. Das Pellet wurde aufgenommen in 100 µl PBS-Puffer und sogleich der Proteingehalt mit Bio-Rad bestimmt. Nach der erfolgreichen Gehaltsbestimmung wurde die Probe mit 4x SDS-Ladepuffer vermischt und bei 37°C für 30 min erwärmt. Im Anschluss konnte die Probe zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

##### **Proteingehaltsbestimmung – Bio-Rad**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde das Bio-Rad Proteinassay Reagenz gemäß den Herstellervorschriften verwendet.

Die Proteinprobe, meist 0,8 µl, wurde mit Wasser zu einem Endvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Die Mischung wurde gründlich gemischt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Probe bei einer Wellenlänge von OD<sub>595</sub> vermessen und die Proteinkonzentration berechnet. Als Standard dienten unterschiedliche Mengen an BSA.

### 3.2.2 Präparation der Membranproteine aus *E. coli*

Zur Expressionskontrolle in *E. coli* wurde die Totalmembranfraktion der transformierten *E. coli* isoliert.

#### Probenaufbereitung der Membranproteine aus *E. coli*

Die Zellen wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min), anschließend mit 25 ml kaltem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min), dann mit 30 ml kaltem 1x TBS-Puffer gewaschen und nach der Zentrifugation (2 200 x g, 4°C, 5 min) wieder in 25 ml kaltem 1x TBS-Puffer aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 1 300 bar und 4°C mit der French Press lysiert. Für eine bessere Ausbeute wurde der Vorgang der Lysierung zweimal wiederholt.

Darauf folgte eine erneute Zentrifugation (9 000 x g, 4°C, 10 min), der Überstand wurde abgenommen und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (100 000 x g, 4°C, 45 min). Danach wurde der Überstand verworfen und das Proteinpellet in 100 µl PBS-Puffer aufgenommen, der Proteingehalt mithilfe von Bio-Rad bestimmt und die Probe mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 37°C für 30 min erwärmt. Im Anschluss konnte die Probe zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Es wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli angewendet. Als Geräte dienten die PerfectBlue vertikalen Doppelgelsysteme Twin S. Die angegebenen Mengen waren ausreichend für 2 Gele (die fertigen Gele können bei 6°C für eine Woche gelagert werden):

	Trenngel		Sammelgel
	10%ig	12,5%ig	5%ig
Wasser	5 ml	4 ml	2,4 ml
4x Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
4x Sammelgelpuffer			1 ml
Acrylamid-Lösung	4 ml	5 ml	0,6 ml
TEMED	10 µl	10 µl	6 µl
10% APS	80 µl	80 µl	25 µl

**Tabelle 3.6:** Zusammensetzung der 10% und 12,5%igen Trenngele und des 5%igen Sammelgels.

Die Proteinproben wurden mit Ladepuffer versetzt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Das Gel wurde zu Beginn mit 160 V laufen gelassen, bis die Proben das Trenngel erreichten, dann wurde die Spannung auf 180 V erhöht. Die Laufzeit betrug somit zwischen 90 und 120 min.

Als Proteingrößenstandard dienten 5 µl peqGOLD Protein-Marker III (prestained; Größenbereich 19 - 118 kDa) oder 10 µl peqGOLD Protein-Marker I (unstained, Größenbereich 14 - 116 kDa) der Firma Peqlab.

Die SDS-Gele konnten angefärbt werden oder sie wurden für den Westernblot verwendet.

Die Anfärbung der SDS-Gele erfolgte mittels Coomassie-Brilliant-Blau (Rotiphorese® Blau R) für 1 h, die Entfärbung fand über Nacht statt. Weiterhin stand eine kolloidale Färbelösung (Roti® Blue) zur Verfügung. Hier wurden die Gele über Nacht angefärbt und im Anschluss lediglich mit Wasser entfärbt.

#### 3.2.4 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblots und anschließender Immundetektion können einzelne Proteine spezifisch nachgewiesen werden.



### **Immunblot-Analyse**

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Trägermembran transferiert. Der Transfer erfolgte nach der Methode des Semidry-Elektrotransfers in einer Blotting-Apparatur. Man ging wie folgt vor: Die PVDF-Membran und 6 Whatmanpapiere wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Die Membran wurde für 5 min in Methanol aktiviert, die Whatmanpapiere dagegen nur kurz in Transferpuffer gegeben. Anschließend baute man den Blot luftblasenfrei von unten nach oben folgendermaßen zusammen: (Anodenplatte); 3 getränkte Whatmanpapiere, die Membran, das SDS-Gel und zum Schluss erneut 3 getränkte Whatmanpapiere (Kathodenplatte). Der Proteintransfer fand für 90 min bei einer konstanten Spannung von 10 V statt. Im Anschluss wurden die Whatmanpapiere verworfen und das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz angefärbt. Die Membran wurde mit Ponceau S für 5 min angefärbt und der Größenstandard markiert.

### **Immundetektion geblotteter Proteine**

Die Membran wurde zum Blockieren in M-TBS-T-Puffer gelegt und für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Blockierlösung wurde verworfen und die Membran mit dem ersten Antikörper in M-TBS-T-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer, jeweils 15 min, entfernt. Der zweite Antikörper wurde wieder in M-TBS-T-Puffer zu der Membran hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Auch hier schloss sich dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils 15 min an. Zur Detektion wurde das ECL Plus Western Blot Detektion System nach Herstellerangaben angewendet. Die Membran wurde in Folie eingeschlagen und die auftretende Chemilumineszenz wurde durch Belichtung von ECL-Hyperfilmen detektiert, die Belichtungsdauer richtete sich hierbei nach der gewünschten Intensität der Banden. Die Entwicklung erfolgt automatisch mit der Entwicklermaschine Cawomat.

Die entwickelten Filme wurden zur Detektion eingescannt.

## **3.2.5 Wachstumstest von *S. cerevisiae* auf Agarplatten**

Von den SD HLK-Platten der transformierten Hefe wurde jeweils eine Kolonie in 1,5 ml SD HLK-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 29°C unter Schütteln

(180 U/min) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde diese Hefesuspension zentrifugiert (16 000 x g, 30 s) und der Überstand verworfen. Das Hefepellet wurde zweimal mit 1 ml Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert (16 000 x g, 30 s) und der Überstand entfernt. Es folgte die Resuspension in 500 µl Wasser, anschließend wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Jede Hefesuspension wurde auf eine optische Dichte von 1 eingestellt und ausgehend davon wurden Verdünnungsreihen aufgestellt: OD<sub>600</sub> von 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup>.

Auf die bereitgestellten Hefeagarplatten, wurden jeweils 5 µl der Suspensionen pipettiert, ausgehend OD<sub>600</sub> von 1, es folgten OD<sub>600</sub> von 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup>. Nach dem Pipettieren wurden die Agarplatten bis zum Verdunsten des Wassers stehen gelassen und im Anschluss für 4 - 7 Tage bei 29°C inkubiert.

#### 3.2.5.1 Methylamin-Efflux-Assay

Der Methylamin-Efflux-Assay ermöglicht die Untersuchung von Aquaporinen in Bezug auf ihre Methylamin-Leitfähigkeit (Wu *et al.*, 2008).

Für die Testung wurde der BY4742Δfps1 Hefestamm verwendet. Hierbei ist das endogene Aquaglyceroporin Fps1, welches auch Methylamin leiten kann, deletiert. Die Agarplatten, mit den pH-Werten 5,5, 6,5 und 7,5 sind versetzt mit 50 mM Methylammoniumchlorid. Das Methylammonium wird von drei endogenen Ammoniumtransportern in die Hefe aufgenommen (Mep 1-3), wobei es von der Hefe nicht metabolisiert werden kann. Bei Akkumulation in der Hefe führt das toxische methylierte Ammonium zu einem verringerten Zellwachstum (Beitz *et al.*, 2006a). Fps1 in der Wildtyp-Hefe BY4742 ist in der Lage ungeladenes Methylamin aus der Hefezelle zu schleusen. Das Methylammonium liegt im Gleichgewicht mit Methylamin vor. Je nach pH-Wert der Agarplatten liegen unterschiedliche Konzentrationen an Methylamin in dem Medium der Hefeplatten vor, in der folgenden Tabelle 3.7 sind die Konzentrationen prozentual aufgeführt. Der pK<sub>S</sub>-Wert des Methylamins liegt bei 10,64.



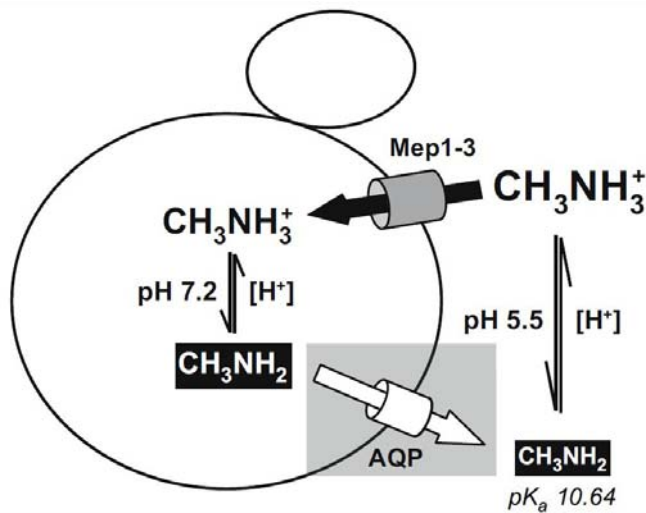
	$c(\text{CH}_3\text{NH}_3^+)$	$c(\text{CH}_3\text{NH}_2)$
pH 5,5	99,9993%	0,0007%
pH 6,5	99,993%	0,007%
pH 7,5	99,93%	0,07%

**Tabelle 3.7:** Angabe der vorherrschenden Konzentration an  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  und  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  bei verschiedenen pH-Werten.

Das Cytosol der Hefezelle hat einen pH-Wert, der zwischen 6,8 und 7,2 liegt. Aus der Tabelle wird deutlich, dass bei niedrigerem pH-Wert weniger Methylamin im Medium der Hefepplatten vorliegt und somit der chemische Gradient zwischen Hefezelle und Umgebung größer ist als bei höheren pH-Werten. Die von der Hefe exprimierten Aquaglyceroporine können nun das Fehlen des Fps1 kompensieren und der Hefe zum normalen Wachstum verhelfen. Der Methylamingradient verringert sich mit steigendem pH-Wert, wobei er bei 6,5 annähernd mit der Hefe gleich ist und sich bei pH 7,5 sogar umgekehrt (Wu *et al.*, 2008).

Als Positivkontrolle wurde zum einen der nicht-deletierte BY4742-Hefestamm verwendet, zum anderen aber auch BY4742 $\Delta$ fps1, in dem *E. coli* GlpF exprimiert wurde.

In dem folgenden Schaubild Abbildung 3.2 wird das Prinzip des Methylamin-Assays noch einmal verdeutlicht:



**Abbildung 3.2:** Schema des pH-abhängigen Transports von Methylamin/Methylammonium in Hefezellen ohne Fps1. Die Aufnahme des toxischen Methylamins erfolgt über endogene Ammoniumtransporter Mep1 - 3. Bei Akkumulation in der Hefe führt das toxische methylierte Ammonium zu einem verringerten Zellwachstum. Exprimierte Aquaporine können die Funktion der Entgiftung übernehmen (Wu et al., 2008).

Für den Methylamin-Efflux-Assay wurden folgende Agarplatten hergestellt:  
Lösung A wurde in einem sterilen Gefäß vermischt und im Wasserbad auf 55°C erwärmt.

#### Lösung A

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
5x YNB		24 ml	
5x Glucose		24 ml	
1 M Methylamin		6 ml	
5% Prolin		2,4 ml	
2% Leucin		1 ml	
2% Lysin		0,2 ml	
2% Histidin		0,2 ml	

Für Lösung B wurde der angegebene pH-Wert mit NaOH eingestellt, im Anschluss daran 2,5 g Oxid-Agar hinzugegeben und autoklaviert.

**Lösung B**

	<b>pH 5,5</b>	<b>pH 6,5</b>	<b>pH 7,5</b>
1 M MES	2,4 ml	2,4 ml	
1 M MOPS			2,4 ml
Wasser	ad 64,4 ml	ad 64,4 ml	ad 64,4 ml

Nach dem Erwärmen von Lösung A und Autoklavieren von Lösung B wurden vier Agarplatten ausgegossen.

**3.2.5.2 Glycerol-Efflux-Assay**

Der Glycerol-Efflux-Assay ermöglicht die Untersuchung von Aquaglyceroporinen in Bezug auf ihre Glycerol-Leitfähigkeit (Uzcategui *et al.*, 2004).

Das Aquaglyceroporin Fps1 ist entscheidend für die osmotische Regulation der Hefe. Es ermöglicht den Hefezellen schnell auf osmotische Änderungen zwischen dem Zellinneren und dem Umfeld zu reagieren (Luyten *et al.*, 1995). Hyperosmotische Bedingungen bewirken ein Verschließen des Kanals, um die intrazelluläre Glycerolkonzentration zu erhalten. Außerdem wird mehr Glycerol durch Kohlenhydratstoffwechsel von der Zelle selbst zur Verfügung gestellt. Diese beiden genannten Punkte führen insgesamt zu einer Erhöhung des zellulären osmotischen Druckes und somit zu einem Ausgleich des osmotischen Gradienten auf beiden Seiten der Hefezellwand. Hypoosmotische Bedingungen dagegen bewirken eine Öffnung des hefeeigenen Fps1-Aquaglyceroporins, so dass das zelluläre Glycerol die Hefezelle in Richtung des osmotischen Gradienten verlässt. Zusätzlich sinkt auch die eigene Glycerol-Biosynthese (Hohmann, 2002). Die Hefezelle passt sich erneut durch diese Maßnahmen dem osmotischen Gradienten an. Hefen, bei denen das eigene Fps1-Aquaglyceroporin deletiert ist, können die genannten Anpassungen an das osmotische Gefälle nicht mittragen. Bei einem hypoosmotischen Schock zeigen diese veränderten Hefen ein verringertes Wachstum, da das Glycerol die Zelle nicht verlassen kann (Tamas *et al.*, 1999).

Hefen mit exprimierten und funktionstüchtigen Aquaglyceroporine sollten unter hypoosmotische Bedingungen normal wachsen können.

Für die Testung wurde der BY4742 $\Delta$ fps1-Stamm verwendet und analog vorgegangen wie unter 3.2.5 beschrieben, jedoch mit wenigen Abänderungen. Eine einzelne Kolonie der transformierten Hefe wurde über Nacht bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) in flüssigem SD HLK-Medium mit 1 M Glycerol, somit in einem hyperosmotischen Medium, inkubiert. Die Zelle produziert folglich selber Glycerol und die intrazelluläre Glycerolproduktion steigt.

Als Hefeagarplatten wurden zum einen eine SD HLK-Agarplatte verwendet, und zum anderen eine SD HLK-Agarplatte inklusive 1 M Sorbitol. Die sorbitolhaltige Agarplatte diente dabei der Kontrolle, wogegen die sorbitolfreie Platte den hypoosmotischen Schock generiert.

#### 3.2.5.3 Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay

Der Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay ermöglicht die Untersuchung der Aquaporine in Bezug auf ihre Ammoniak- und Ammonium-Leitfähigkeit (Beitz *et al.*, 2006a).

Für die Testung wird die veränderte Hefe 31019 $\Delta$ fps1 verwendet. Hierbei ist das endogene Aquaglyceroporin Fps1, welches auch Ammoniak leiten kann, genau so wie die drei endogenen Ammoniumtransporter Mep1-3 deletiert.

Die Hefezelle ist angewiesen auf die Aufnahme von Ammoniak als Stickstoffquelle. Die Agarplatten, mit den pH-Werten 5,5, 6,5 und 7,5 sind versetzt mit 2 mM Ammoniumsulfat, welches die einzige Stickstoffquelle darstellt.

Das Ammonium liegt im Gleichgewicht mit Ammoniak vor. Je nach pH-Wert der Agarplatten liegen unterschiedliche Konzentrationen an Ammoniak in dem Medium der Hefeplatten vor, in der folgenden Tabelle sind die Konzentrationen prozentual aufgeführt. Der pK<sub>S</sub>-Wert des Ammoniaks liegt bei 9,25.



	$c(\text{NH}_4^+)$	$c(\text{NH}_3)$
pH 5,5	99,982 %	0,018%
pH 6,5	99,82 %	0,18 %
pH 7,5	98,2 %	1,8 %

**Tabelle 3.8:** Angabe der vorherrschenden Konzentration an  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NH}_3$  bei verschiedenen pH-Werten.

Wenn Ammoniak über exprimierte Aquaporine aufgenommen wird, zeigt sich dies durch ein verstärktes Wachstum der Hefen. Als Positivkontrolle wurde ein Ammoniumtransporter aus der Tomate verwendet (LeAMT1;1), er zeigt eine pH-unabhängige Ammoniumaufnahme (Khademi *et al.*, 2004). Bei diesem Test ist das Hintergrundwachstum durch Ammoniakaufnahme über die Membran relativ hoch, daher muss der Test immer im Vergleich zur Negativkontrolle gesehen werden.

Für den Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay wurden folgende Platten hergestellt:

Lösung A wurde in einem sterilen Gefäß im Wasserbad auf 55°C erwärmt.

#### Lösung A

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
5x YNB		24 ml	
5x Glucose		24 ml	

Für Lösung B wurde der angegebene pH-Wert mit NaOH eingestellt, im Anschluss 2,5 g Oxoid-Agar hinzugegeben und autoklaviert.

#### Lösung B

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
0,5 M Succinatlg	9,6 ml		
1 M MES		4,8 ml	
1 M MOPS			4,8 ml
1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	240 µl	240 µl	240 µl
Wasser	ad 72 ml	ad 72 ml	ad 72 ml

Nach dem Erwärmen von Lösung A und Autoklavieren von Lösung B wurden je vier Agarplatten ausgegossen.

#### Untersuchung der Ammoniak-Leitfähigkeit in Flüssigkultur

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Ammoniak-Leitfähigkeit bestand in der Verwendung von Flüssigkulturen. Hierzu wurden die Hefekulturen auf die gleiche OD<sub>600</sub> eingestellt und das Hefewachstum in festgelegten Zeitintervallen automatisch vermessen.

Eine einzelne Hefekolonie wurde über Nacht bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert, am nächsten Morgen in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert bei 13 000 x g, 1 min. Der erhaltene Heferückstand wurde zweimal mit Wasser gewaschen und im Anschluss wieder in 200 µl Wasser aufgenommen. Es wurde die optische Dichte bestimmt und die Hefen auf OD<sub>600</sub> von 6 eingestellt. In die 100 Loch-Microtiterplatten des Bioscreen C-Geräts wurden jeweils 290 µl der Testmedien vorgelegt. Dazu wurden jeweils 10 µl der Hefen pipettiert, so dass am Ende eine optische Dichte von ca. 0,2 resultierte. Jede Probe wurde fünfmal pipettiert. Als Testmedien diente zum einen SD HLK-Medium und zum anderen Ammoniak-Testmedium (Bioscreen) pH 6,9.

Die Geräteparameter wurden wie folgt eingestellt: Breitbandfilter (420 - 580 nm), Messung alle 30 min, wobei vor jeder Messung die zwei Mikrotiterplatten für 10 s geschüttelt wurden, Messdauer 48 h.



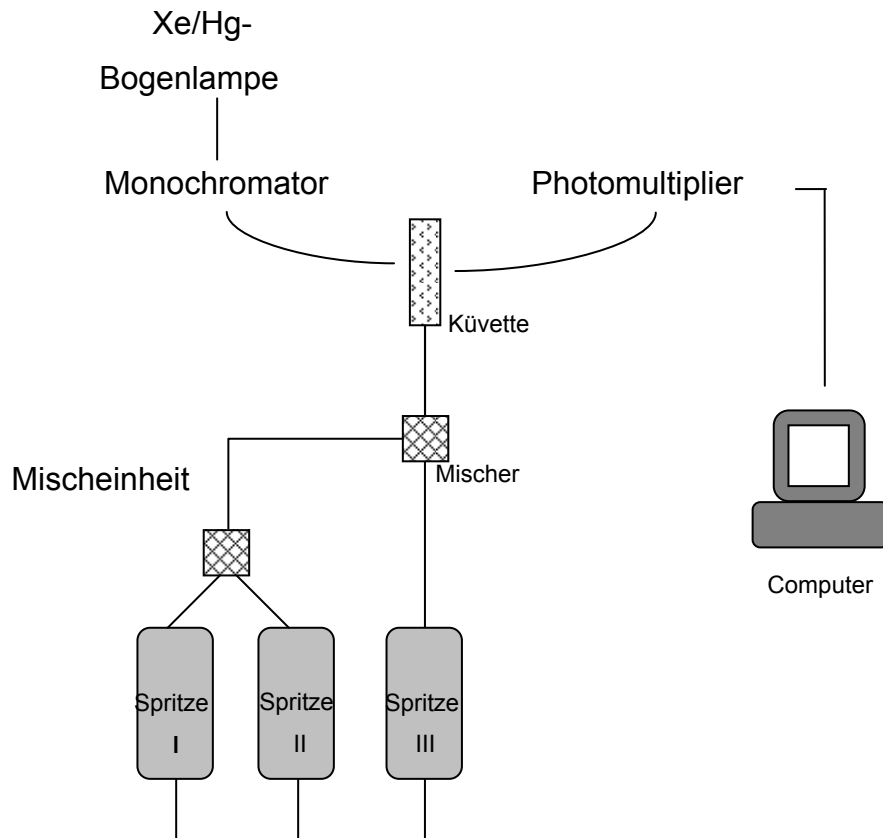
## 3.2.6 Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur

### 3.2.6.1 Prinzip der Stopped-Flow-Messung

Das Grundprinzip der Stopped-Flow-Messungen ist das schnelle Mischen zweier bzw. dreier Lösungen und die sofortige spektroskopische Messung. Diese Technik erlaubt es Absorption, Fluoreszenz und Lichtstreuung in einer Zeitskala im Bereich von Millisekunden zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apparatur der Firma BioLogic, bestehend aus der Mischeinheit (SFM 300) und der Detektionseinheit (MOS 200) verwendet. Der Anschluss der Mischeinheit an ein Wasserbad erlaubt das Messen bei verschiedenen Temperaturen. In der Mischeinheit befinden sich drei Vorratsspritzen mit bis zu 10 ml Messlösung. Vom Computer aus gesteuert wird die Flüssigkeitsmenge und Flussrate mit Hilfe des Programms Bio-Kine festgelegt. Die vorher bestimmte Mischung wird aus den Spritzen freigesetzt und nach schneller Mischung in die Küvette (FC-08) weitergeleitet. Am Ende der Küvette liegt ein Ventil, welches den Fluss des Reaktionsgemisches aus der Küvette heraus registriert, woraufhin das Ventil geschlossen und der Antrieb der Spritzen gestoppt wird. Die Küvette wird mit monochromatischem Licht einer Xenon/Quecksilber-Bogenlampe beleuchtet, die Messung der Lichtstreuung findet im Winkel von 90° statt. Die Wellenlänge wurde bei Messungen mit *E. coli* und *S. cerevisiae*-Protoplasten unterschiedlich gewählt. Bei Messungen mit *E. coli* wurde die Wellenlänge bei 575 nm festgelegt, bei *S. cerevisiae*-Protoplasten dagegen bei 436 nm. Das Signal des gestreuten Lichts wird durch einen angeschlossenen Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt.

Die Daten wurden mit Hilfe der Software des Gerätes analysiert (Bio-Kine von BioLogic).



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der Stopped-Flow-Apparatur.

#### 3.2.6.2 *E. coli*-Messungen

##### Vorbereitung der *E. coli* zur Messung mit der Stopped-Flow-Apparatur

Die *E. coli* wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wachsen gelassen, die Kultur am nächsten Morgen zweimal mit jeweils 1 ml M9-Medium gewaschen, dann in M9-Medium auf eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,1 gebracht und weiter inkubiert bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,4. Eine eventuelle Induktion durch IPTG (10 µM, 100 µM oder 1 mM) erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 und weiterer Inkubation für 1,5 h bzw. 3 h. Für die Messungen in der Stopped-Flow-Apparatur wurde die Suspension jeweils mit M9-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 gebracht.

Die Wasserleitfähigkeitsmessungen fanden statt in M9-Medium inkl. 1 M Sorbitol als osmotisch wirksames Reagenz. Bei der Messung ergab sich somit ein auswärtsgerichteter Gradient von 500 mM Sorbitol. Die Glycerol-Leitfähigkeitsmessungen fanden statt in M9 inkl. 500 mM Glycerol, wodurch sich ein Gradient von 250 mM Glycerol ergab. Jede Messlösung wurde zusätzlich mit 2% Ficoll versetzt.

Ficoll diene ausschließlich der Viskositätserhöhung, somit konnten das Rauschsignal möglichst gering gehalten werden (Hubert *et al.*, 2005).

### Aufnahme von Messkurven mit *E. coli*

Die Parameter bei der Aufnahme von Wasserleitfähigkeits- und Glycerol-Leitfähigkeits-Messkurven in der Stopped-Flow-Apparatur mit *E. coli* waren die folgenden, wobei die Einstellung der Spritzeinrichtung immer gleichwährend gehalten wurde (Gesamtvolumen 150 µl; Flussrate 5,0 ml/s; Totzeit 7,3 ms):

#### Wasserleitfähigkeit:

Licht	436 nm	
Temperatur	20°C	
Aufnahmerate	500 µs	8000 Datenpunkte → 3,995 s

#### Glycerol-Leitfähigkeit:

Licht	436 nm	
Temperatur	20°C	
Aufnahmerate	2 ms	8000 Datenpunkte → 15,995 s

**Tabelle 3.9:** Angaben der Geräteparameter der Stopped-Flow-Apparatur für die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeitsmessung mit *E.coli*

### 3.2.6.3 Protoplasten von *S. cerevisiae*

Unter Protoplasten versteht man Hefezellen ohne rigide Zellwand. Die folgenden Versuche wurden mit der Hefe BY4742Δfps1 durchgeführt.

#### Protoplastierung von *S. cerevisiae*

Die Protoplastierung einer Hefezelle dient dem Abbau der rigiden Zellwand, wodurch Veränderungen der Hefezellgröße durch Wassereintritt oder -austritt sichtbar werden. Der Abbau der Zellwand von *S. cerevisiae* erfolgte mittels des Enzymgemisches Zymolyase-20T. Das Enzymgemisch enthält neben β 1,3-Glucanasen zum Abbau der Zellwand auch Proteasen. Um eine Schädigung der Kanalproteine durch Proteasen zu verhindern, muss man durch Proteasen spaltbare Substrate (in unserem Falle Rinderserumalbumin-BSA) in ausreichender Menge hinzufügen.

Das Protokoll zur Herstellung der Protoplasten wurde in unserem Arbeitskreis im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Ein Protokoll wurde uns freundlicherweise vom Arbeitskreis um Kaldenhoff zur Verfügung gestellt, dieses wurde adaptiert (Bertl *et al.*, 1998).

Die Hefe BY4742 $\Delta$ fps1 wurde für 16 h bei 29°C unter Schütteln (180 U/min) in 20 ml SD HLK-Medium inkubiert. Am nächsten Morgen, bei einer optischen Dichte OD<sub>600 nm</sub> von ca. 1,5, wurde die Hefesuspension zentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und im Anschluss das Nasspellet-Gewicht notiert. 40 mg des Zellrückstands wurden in 3 ml Puffer I resuspendiert und für 15 min bei 29°C und 150 U/min inkubiert. Daraufhin wurde zu der Suspension 6 ml Puffer II und 100 mg BSA gegeben, bis zum Auflösen des BSA wurde die Mischung vorsichtig geschüttelt. Die Berechnung der Zugabe an Zymolyase 20T erfolgte nach dem Nasspellet-Gewicht, wobei 450 U Zymolyase/g Nasspellet in unseren Versuchen ausreichend waren. Es folgte eine weitere Inkubation über 60 min bei 29°C und unter vorsichtigem Schütteln von 60 U/min. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (2 200 x g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml Puffer IV gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (2 200 x g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und der Rückstand erneut in 5 ml Puffer IV aufgenommen. Bis zur eigentlichen Messungen wurde diese Suspension gekühlt verwahrt.

#### **Testung der Protoplasten**

Die Protoplasten wurden vor der Messung einer Kontrolle unterzogen, um eine hinreichende Protoplastierung bei jedem Ansatz zu gewährleisten. Hierzu wurde nach Pringle folgender Test mit einer leichten Veränderung durchgeführt (Pringle *et al.*, 1979): Pro Ansatz wurde jeweils eine Küvette mit 1,45 ml Wasser und eine mit 1,45 ml Puffer IV, welcher 1,2 M Sorbitol enthält, bereitgehalten. Vor Zugabe der Zymolyase und nach einer einstündigen Inkubation wurden jeweils 50  $\mu$ l des Hefeansatzes zu den bereitgestellten Küvetten pipettiert und photometrisch bei OD<sub>600</sub> vermessen. Die Veränderung der Protoplasten über die Zeit in den verschiedenen osmotischen Verhältnissen konnte somit detektiert werden. In Wasser können die Protoplasten dem osmotischen Gefälle nicht länger standhalten und platzen, was zu einer Abnahme der optischen Dichte führt. Analog dazu verändern sich die Protoplasten in sorbitolhaltiger Lösung in Bezug auf ihre Größe kaum und auch die optische Dichte bleibt beinahe unverändert.

### **Bestimmung der Größe von *S. cerevisiae*-Protoplasten**

Die Bestimmung der Protoplasten-Größe wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops durchgeführt mit freundlicher Unterstützung des Arbeitskreises Prof. Blaschek, die Vergrößerung betrug 1 : 1000. Die Zellen einer Über-Nacht-Kultur wurden protoplastiert und in Puffer III und Puffer IV gemischt aufgenommen. Eine geringe Menge davon wurde mikroskopiert und die Protoplastengröße anhand der Größenskala im Mikroskop analysiert.

### **Lagerfähigkeit von Protoplasten**

In der Literatur gab es keine Angaben darüber wie lange Protoplasten in ihrem Messmedium gelagert werden können, bevor es zu einer Abnahme ihrer Schwell- oder Schrumpfeigenschaft kommen würde. In der Literatur wurden sie gleich nach ihrer Produktion für Messungen verwendet.

Zur Ermittlung der Lagerfähigkeit von Protoplasten wurden Protoplasten hergestellt, im Messmedium bei 6°C (Kühlschrank) gelagert und zu verschiedenen Zeiten (Tag 0, Lagerung nach 1 Tag, 2 Tagen, 3 Tagen, 4 Tagen und 7 Tagen) in der Stopped-Flow-Apparatur vermessen.

### **Aufnahme von Messkurven mit *S. cerevisiae*-Protoplasten**

Es wurden sowohl Messkurven durch Wasserabgabe von in Hefen exprimierten Aquaporinen aufgenommen, wie auch Messkurven durch Glycerolaufnahme bzw. -abgabe und die Kombination von Wasserabgabe und Glycerolaufnahme.

Die Hefeprotoplasten wurden aufgenommen und gelagert in Puffer IV, die Wasserleitfähigkeitsmessungen fanden statt bei Mischung mit Puffer III, welcher 600 mM mehr Sorbitol als Puffer IV enthält. Das Sorbitol als osmotisch wirksames Reagenz führt bei der Messung somit zu einem auswärtsgerichteten osmotischen Gradienten von 300 mOsm. Die Glycerol-Leitfähigkeitsmessungen fanden statt in Puffer IV inkl. 600 mM Glycerol, wodurch sich bei Mischung ein chemischer Gradient von 300 mM Glycerol ergab.

Die Parameter der Kurvenaufzeichnung in der Stopped-Flow waren dabei die folgenden, wobei die Einstellung der Spritzeinrichtung immer gleichwährend gehalten wurde (Gesamtvolumen 150 µl; Flussrate 6,5 ml/s; Totzeit 5,6 ms):

#### Wasserleitfähigkeit:

Licht	436 nm	
Temperatur	20°C/36°C	
Aufnahmerate	5 ms	8000 Datenpunkte → 39,995 s

#### Glycerol-Leitfähigkeit:

Licht	436 nm	
Temperatur	20°C	
Aufnahmerate	10 ms	8000 Datenpunkte → 79,995 s

#### Glycerol-Leitfähigkeit in Kombination mit Wasserleitfähigkeit:

Licht	436 nm	
Temperatur	20°C/36°C	
Aufnahmerate	5 ms	8000 Datenpunkte → 39,995 s

**Tabelle 3.10:** Angaben der Geräteparameter der Stopped-Flow-Apparatur für die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeitsmessungen mit *S. cerevisiae*-Protoplasten.

#### 3.2.6.4 Vesikel von *S. cerevisiae*

Die Messung mit Vesikeln erhöht durch das vergrößerte Oberflächen-Volumen-Verhältnis die Auswirkung der Aquaporine und somit die Sensitivität der Wasserleitfähigkeit.

Für die Vesikelpräparation wurde der Hefestamm NY17 gewählt, dies ist ein temperatursensitiver  $\Delta$ sec6-4 Hefestamm. Im letzten Schritt des sekretorischen Pfades für Proteine der NY17-Hefe liegt ein Defekt vor. Ein lösliches 85 kDa Protein, welches am Transport der Post-Golgi-Vesikel beteiligt ist, ist betroffen: dadurch werden bei 37°C sekretorische Vesikel im Cytosol sechsmal stärker als in Wildtyp-Hefen akkumuliert. Die Vesikel enthalten Membranproteine und somit die exprimierten Aquaporine, welche zur Plasmamembran transportiert werden sollen.

Bei der Expression müssen zwei Temperaturschritte durchlaufen werden. Zuerst wachsen NY17-Hefen in einem Selektionsmedium bei 25°C, um dann bei 37°C weiter inkubiert zu werden. Bei 25°C wachsen die Hefen normal, da das sec6-Protein stabil ist und die Hefe somit ungehindert Membranproteine transportieren kann. Erst

bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C wird das sec6-Protein zerstört und folglich akkumulieren die sekretorischen Vesikel im Cytoplasma (Potenza *et al.*, 1992).

### **Vesikelpräparation von *S. cerevisiae***

Das Protokoll zur Isolierung von sekretorischen Vesikeln wurde im Rahmen dieser Arbeit in unserem Arbeitskreis etabliert. Dabei wurden verschiedene Veröffentlichungen hinzugezogen (Coury *et al.*, 1998; Ambesi *et al.*, 1997; Laizé *et al.*, 1995; Nakamoto *et al.*, 1991; Walworth & Novick, 1987).

Die Hefe NY17 wurde wie unter 3.1.12 beschrieben transformiert und bei 25°C für 3 bis 4 Tage wachsen gelassen.

Von der Selektionsplatte wurde eine große Hefekolonie in 20 ml SD HLK-Medium gegeben und über Nacht bei 25°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz in 100 ml SD HLK-Medium überführt und unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 2,5 wachsen gelassen, erneut 100 ml SD HLK-Medium dazugegeben und wieder bis zu OD<sub>600</sub> von 2,5 wachsen gelassen. Dann erst wurde der gesamte Ansatz für 3 h bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) inkubiert und die optische Dichte bestimmt. Die OD<sub>600</sub> sollte bei 800/ml (OD<sub>600</sub>-Einheiten) liegen, was bedeutet, dass 200 ml der Hefesuspension eine optische Dichte von 4 haben sollten. Die Hefesuspension wurde bei 2 000 x g, 5 min und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Nasspellet-Gewicht bestimmt. Aufgrund des Gewichts wurde dann die Protoplastierung analog 3.2.6.3 vorgenommen. Nach dem Abzentrifugieren (2 000 x g, 5 min, 4°C) wurde das Pellet in 15 ml Protoplastenmedium aufgenommen, erneut zentrifugiert und wiederum in 15 ml Protoplastenmedium aufgenommen. Die optische Dichte wurde bestimmt und in OD<sub>600</sub>-Einheiten umgerechnet. Aufgrund dieser Berechnung wurden 25 mg pro 1 600 OD<sub>600</sub>-Einheiten Concanavalin A der Concanavalin A-Lösung zu dem Ansatz hinzugegeben, die Mischung auf einem Eisbett unter leichtem Schütteln (90 U/min) 15 min lang inkubiert, im Anschluss folgte eine erneute Zentrifugation (2 000 x g, 5 min, 4°C). Der Rückstand wurde in Lysepuffer aufgenommen, wobei sich die Menge aus der optischen Dichtemessung vor der Concanavalin A-Zugabe ergab. Der Rückstand wurde dabei so aufgenommen, dass sich eine optische Dichte von 60 bis 70 OD<sub>600</sub>-Einheiten ergab. Die erhaltene Suspension wurde nun in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit dessen Hilfe auf Eis durch 50 Hübe geschert. Die Suspension wurde zentrifugiert (10 000 x g, 10 min, 4°C) um Zellkerne und

Mitochondrien abzutrennen. Die Vesikel wurden bei 100 000 x g, 45 min und 4°C gesammelt. Das erhaltene Vesikelpellet wurde in Puffer IV aufgenommen und, um eventuell verbliebene größere Teilchen abzutrennen, filtriert. Zur Filtration wurde LiposoFast mit einem Durchmesser von 100 nm verwendet.

#### **Bestimmung der Größe von Hefevesikeln**

Die Vesikelgröße und die Viskosität des Puffer IV wurde mit freundlicher Unterstützung des Arbeitskreises von Prof. Steckel mithilfe eines Zetasizer und eines Schwingplatten-Viskosimeters bestimmt. Es wurde von einer Temperatur von 25°C ausgegangen.

Der Zetasizer ist in der Lage Partikelgrößen von 0,6 nm bis 6 µm zu erfassen. Die Messung der Partikelgröße wird dabei ermittelt über die dynamische Lichtstreuung. Die einzelnen Teilchen bewegen sich aufgrund ungerichteter Diffusionsbewegung (Brownsche Molekularbewegung) durch die Probelösung, das eingestrahlte Laserlicht der Wellenlänge 632 nm streut an diesen sich bewegenden Teilchen. Die Detektion, die Messung der Intensität des von den Partikeln gestreuten Lichts, erfolgt in einem Winkel von 90°. Es ist ein Korrelator angeschlossen, der die Streulichtintensität in verschiedenen Zeitintervallen registriert. Bei diesem Versuchsaufbau wurde jede Probe drei Läufen unterzogen, dabei wurde während jedes Laufes 10 Messungen durchgeführt, und jede Messung wiederum lief über eine Zeitspanne von 10 s.

Unter Berücksichtigung der Temperatur und der Viskosität der Probelösung erhält man als Ergebnis neben dem mittleren Teilchendurchmesser auch den Polydispersitätsindex (Pdl). Der Polydispersitätsindex ist dimensionslos und stellt ein Maß für die Größenverteilungsbreite der Teilchen dar. Laut Herstellerangaben liegt bei einem Pdl unter 0,1 eine enge Größenverteilung vor, aber in der Praxis werden auch noch Werte bis 0,3 toleriert. Insgesamt kann der Pdl Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei größere Werte eine breitere Verteilung anzeigen.

Die Viskosität des Puffers hat einen großen Einfluss auf die Ermittlung der Teilchengröße. Daher wurde die Pufferviskosität zweimal mit Hilfe eines Schwingplatten-Viskosimeters bestimmt.



### 3.2.6.5 Auswertung der Stopped-Flow-Parameter

Zur Auswertung der Stopped-Flow-Ergebnisse gibt es verschiedene Ansätze, im Folgenden werden die drei angewendeten Ansätze erläutert und auf die daraus ermittelten Werte eingegangen.

Pro Messung wurden bis zu 9 Kurven gemittelt und die Ratenkonstante, der  $\tau$ -Wert bzw. die Steigung bestimmt.

Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Student t-Test (zweiseitig, ungepaart) verwendet. Dazu wurden die bis zu 9 Einzelkurven ausgewertet und dann der Student t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde im Vergleich zur Negativkontrolle angegeben, wobei \*\*\* für  $p < 0,001$  als signifikant unterschiedlich galt.

#### Aus dem Kurvenverlauf ermittelbare Werte

Aus der aufgenommenen Kurve einer Schrumpfung eines Hefeprotoplasten oder *E. coli* durch Wasseraustritt aus der Zelle konnte man zwei verschiedene Werte ermitteln, zum einen den  $\tau$ -Wert und zum anderen die Ratenkonstante.

Die Ratenkonstante, kurz k-Wert, wurde durch einfach oder zweifach exponentielles Kurvenfitting ermittelt.

Die Ratenkonstante hat die Einheit  $s^{-1}$ .

$$y = at + b + \sum_{i=1}^N ce^{-kt}$$

**Formel 3.1:** Exponentialfunktion der Software Bio-Kine zur Ermittlung des k-Wertes:

$k$  = Ratenkonstante,  $t$  = Zeit

Der  $\tau$ -Wert wird ermittelt ähnlich einer Halbwertszeit. Bei der Kurvenkinetik handelt es sich um eine e-abhängige Funktion, daher kann man den  $\tau$ -Wert direkt aus der Kurvengraphik ablesen. Man geht von dem Ordinatenwert  $1/e$  aus und liest dann den Abszissenwert ab, somit hat der  $\tau$ -Wert die Einheit s.

Zur Ermittlung der Schwellung durch Glyceroleintritt nach erfolgtem Schrumpfen durch Wasseraustritt wurde als Messgröße die Steigung im linearen Abschnitt der Kurve ermittelt.

#### **Berechnung des Koeffizienten der Wasserleitfähigkeit ( $P_f$ ) der Plasmamembran von *S. cerevisiae*-Protoplasten**

Der Koeffizient der Wasserleitfähigkeit ist ein Maß für die Transportgeschwindigkeit von Wasser über eine Membran [ $\mu\text{m/s}$ ].

Er wurde über die folgende Formel 3.2 berechnet:

$$P_f = \frac{1}{\tau} * \frac{V_o}{S_o * V_w * c}$$

**Formel 3.2:** *Formel zur Berechnung des Wasserleitfähigkeitskoeffizienten nach van Heeswijk & van Os, 1986.  $P_f$  = Wasserleitfähigkeitskoeffizient,  $\tau$  =  $\tau$ -Wert,  $V_o$  = Volumen der Protoplasten,  $S_o$  = Oberfläche der Protoplasten,  $V_w$  = molekulares Wasservolumen und  $c$  = Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen.*

#### **Berechnung des Koeffizienten der Glycerol-Leitfähigkeit ( $P_{\text{Gly}}$ ) der Plasmamembran von *S. cerevisiae*-Protoplasten**

Der Koeffizient der Glycerol-Leitfähigkeit ist ein Maß für die Transportgeschwindigkeit von Glycerol über eine Membran [ $\mu\text{m/s}$ ].

Er wurde über die folgende Formel 3.3 berechnet:

$$P_{\text{Gly}} = m * \frac{V_o * \text{osm}_{\text{tot}}}{S_o * c_{\text{sol}}}$$

**Formel 3.3:** *Formel zur Berechnung des Glycerolleitfähigkeitskoeffizienten.  $P_{\text{Gly}}$  = Glycerolleitfähigkeitskoeffizient,  $m$  = Steigung,  $V_o$  = Volumen der Protoplasten,  $S_o$  = Oberfläche der Protoplasten,  $\text{osm}_{\text{tot}}$  = Gesamtosmolarität des Systems und  $c_{\text{sol}}$  = Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen.*

#### **Bestimmung der Arrhenius-Aktivierungsenergie**

Zur Bestimmung der Arrhenius-Aktivierungsenergie wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen. Zur Berechnung wurde die Arrhenius-Gleichung, siehe Formel 3.4 hinzugezogen.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$$

**Formel 3.4:** Arrhenius-Gleichung:  $k$  = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante,  $A$  = Frequenzfaktor,  $E_A$  = Aktivierungsenergie (kcal/mol),  $R$  = allgemeine Gaskonstante (8,314 J/K\*mol),  $T$  = absolute Temperatur (K).

Zur Linearisierung der obigen Funktion wurde die Arrheniusdarstellung genutzt. Dazu wurden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante logarithmisch gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur ( $1/K \cdot 1000$ ) aufgetragen. Die Steigung der entstandenen Gerade entspricht dann  $\ln k/T^{-1}$ . Somit ist eine Vereinfachung der Arrhenius-Gleichung zu der folgenden Gleichung möglich:

$$E_A = m \cdot -R$$

**Formel 3.5:** Vereinfachte Arrhenius-Gleichung:  $E_A$  = Aktivierungsenergie (kcal/mol),  $m$  = Steigung aus der Arrheniusdarstellung ermittelt (K),  $R$  = allgemeine Gaskonstante (8,314 J/K\*mol)



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wachstumsassays mit *S. cerevisiae*

Funktionstests in *S. cerevisiae* sollten zeigen, ob die eingeführten Veränderungen im BccGlpF toleriert werden und eine Expression in Hefen möglich ist. Die Wachstumsassays auf Hefeagarplatten sind rein phänotypischer Natur und lassen eine quantitative Aussage nicht zu.

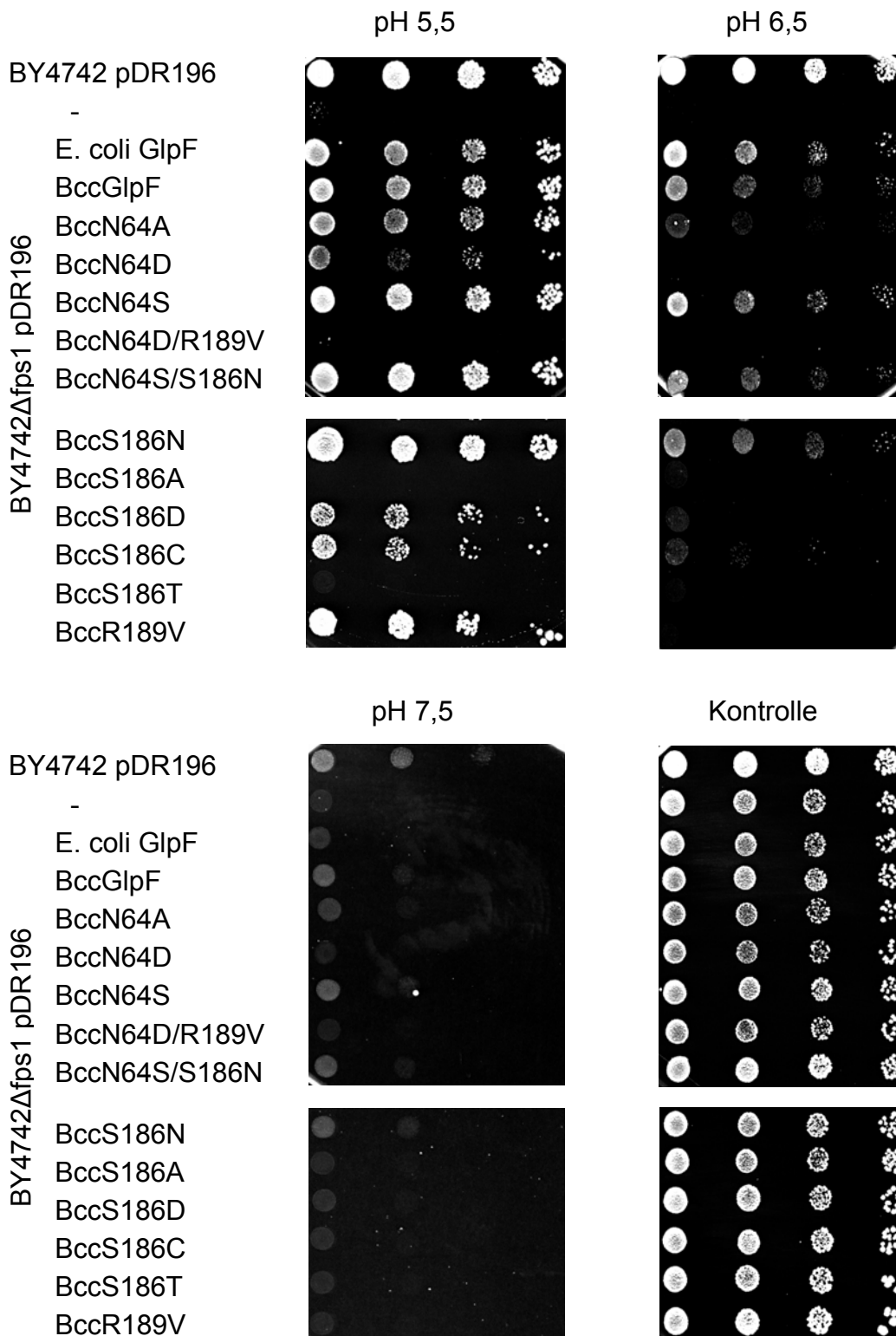
Die Hefetests auf Agarplatten wurden mindestens zweimal wiederholt.

#### 4.1.1 Untersuchung der Methylamin-Leitfähigkeit

Zur Charakterisierung aller BccGlpF-Mutanten wurde der Methylamin-Efflux-Assay durchgeführt.

Der Methylamin-Efflux-Assay beruht auf dem BY4742 $\Delta$ fps1-Hefestamm, dessen fps1-Gen deletiert ist. Methylammonium wird über endogene Ammonium-Transporter in die Hefezelle aufgenommen. Das toxische Methylammonium akkumuliert in der Hefezelle, wenn es nicht wieder als ungeladenes Methylamin über Aquaglyceroporine heraus transportiert werden kann. Als Positivkontrollen dienten zum einen der nicht veränderte Wildstamm BY4742 und zum anderen das im Knockout-Stamm BY4742 $\Delta$ fps1 exprimierte *E. coli* GlpF. Als Negativkontrolle diente mit Leerplasmid transformierte BY4742 $\Delta$ fps1-Hefe.

Je niedriger der pH-Wert der Agarplatte, desto weniger Methylamin ist außerhalb der Hefezelle. Je größer der Methylamingradient zwischen intra- und extrazellulärem Raum ist, desto besser kann die Hefe wachsen. Dieses erklärt das abnehmende Wachstum der Hefen zu pH 7,5 hin.



**Abbildung 4.1:** Methylamin-Efflux-Assay. Gezeigt sind alle BccGlpF-Mutanten exprimiert im Hefestamm BY4742Δfps1. Jede Mutante wurde in vier 10fach-Verdünnungsschritten bei verschiedenen pH-Werten bzw. zur Kontrolle auf SD HLK aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 9 Tage.

Auf den Platten des Methylamin-Efflux-Assays wurde sichtbar, dass sich die BccGlpF-Mutanten unterschiedlich in ihrem Wachstum zeigten. Der deutlichste Effekt zeigte sich auf Platten mit einem pH-Wert von 5,5.

Der Test zeigte (Abbildung 4.1), dass sowohl BccGlpF Wildtyp als auch weitere Mutanten des BccGlpF (BccN64A, BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N, BccS186D, BccS186C und BccR189V) gut auf den Platten wuchsen. Daraus wurde deutlich, dass diese in der Lage sind, das für die Hefezellen giftige Methylamin über die jeweiligen Aquaglyceroporine aus der Zelle heraus transportieren zu können. Somit konnte die erste Funktionalität der Bcc Aquaglyceroporine in Hinsicht auf Methylamin-Leitfähigkeit gezeigt werden. Andere BccGlpF-Mutanten zeigten diese Funktion der Methylamin-Leitfähigkeit nur in geringerem Maße (BccN64D) oder gar nicht (BccN64D/R198V, BccS186A und BccS186T). Bei höheren pH-Werten und somit einem geringeren Gradienten der Methylamin-Konzentration nahm der Effekt ab, wobei BccGlpF Wildtyp, BccN64S, BccS186N und BccN64S/S186N auch noch bei pH 6,5 ein stärkeres Wachstum zeigten. Weitere Mutationen, die bei pH 5,5 schon ein verringertes Wachstum im Vergleich zu dem BccGlpF Wildtyp zeigten, nahmen auch bei dem höheren pH-Wert 6,5 in ihrem Wachstum weiter ab.

Kontrollplatten ohne Methylamin wurden parallel zur Überprüfung des Hefewachstums pipettiert, wobei alle Konstrukte gleichermaßen wuchsen.

### 4.1.2 Untersuchung der Glycerol-Leitfähigkeit

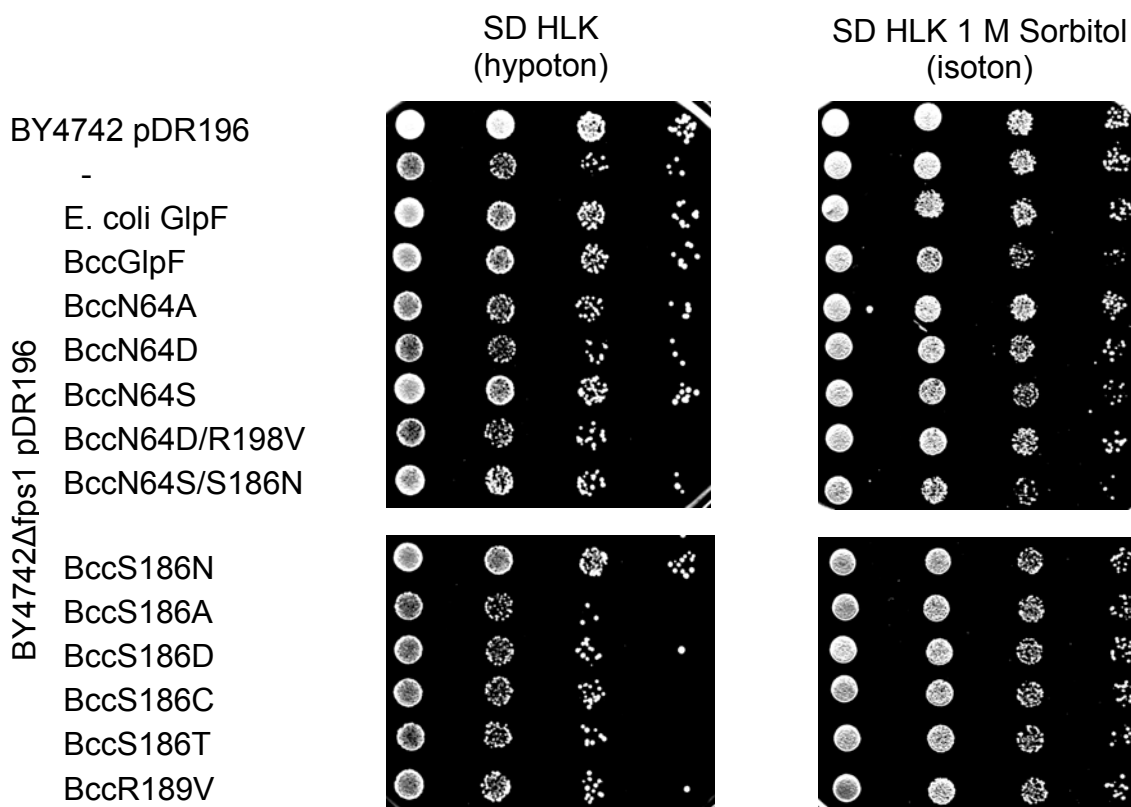
Der Glyceroltest diente analog dem Methylamin-Efflux-Assay zur ersten Einschätzung der Funktionalität überhaupt und weiterhin zur Beobachtung der Glycerol-Leitfähigkeit der verschiedenen BccGlpF-Mutanten.

Wie unter 3.2.5.2 beschrieben wurden für diesen Assay BY4742 $\Delta$ fps1 genutzt, somit müssen die heterolog exprimierten Aquaglyceroporine die Funktion des endogenen Hefeaquaglyceroporins übernehmen und damit zum Ausgleich beitragen. Funktionstüchtige Aquaglyceroporine sollten unter hypoosmotischen Bedingungen zu normalem Hefewachstum führen. Nicht funktionstüchtige oder auch nicht Glycerol leitenden Aquaglyceroporine können das osmotische Gefälle nicht ausgleichen und führen unter hypoosmotischem Schock zu verringertem Wachstum, welches auf eine zu hohe Glycerolbelastung in der Hefezelle schließen lässt.

Es wurden wiederum zwei Positivkontrollen gewählt, zum einen die nicht veränderte Wildstammhefe BY4742 und zum anderen der Knockout-Stamm BY4742 $\Delta$ fps1 mit Expression des *E. coli* GlpF. Als Negativkontrolle diente Leerplasmid transformierte BY4742 $\Delta$ fps1-Hefe, die nur geringes Wachstum zeigen darf.

Die 1 M Sorbitol-haltige SD HLK-Agarplatte wurde hierbei als Kontrolle pipettiert. Die Hefen sollten auf dieser Platte alle gleichermaßen wachsen.

Die SD HLK-Agarplatte wurde für die Interpretation herangezogen.



**Abbildung 4.2:** *Glycerol-Efflux-Assay. Gezeigt sind alle BccGlpF-Mutanten exprimiert im Hefestamm BY4742 $\Delta$ fps1. Jede Mutante wurde in vier 10fach-Verdünnungsschritten auf SD HLK und SD HLK 1 M Sorbitol aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 4 Tage.*

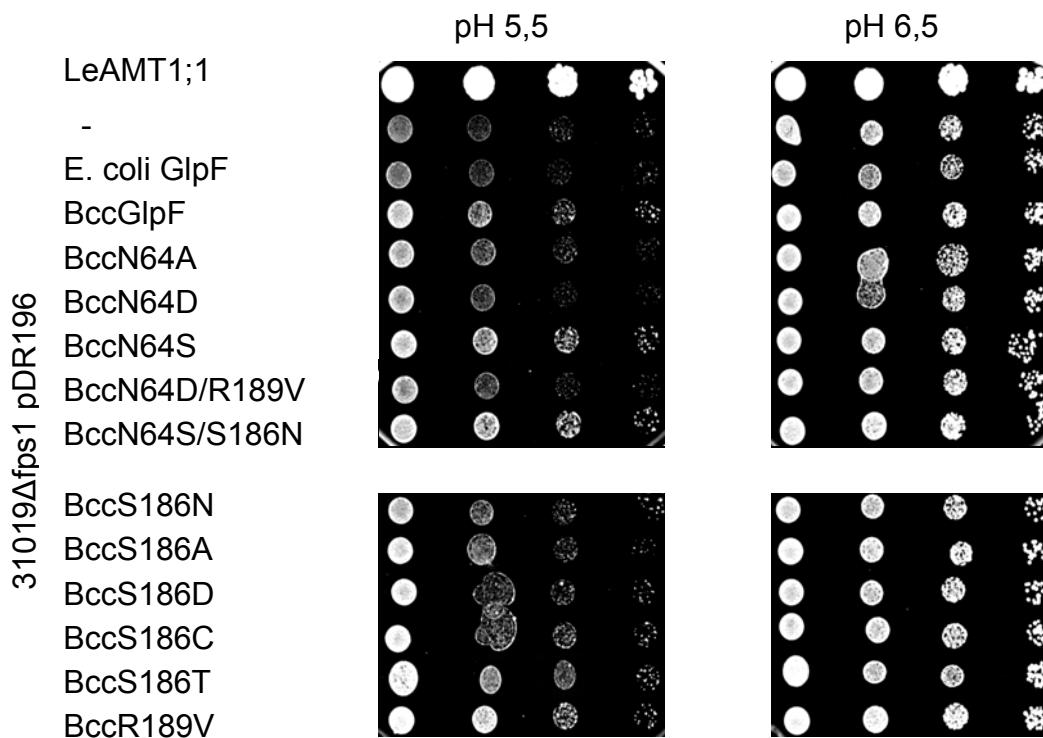
Bei dem Glycerol-Efflux-Assay wurde sichtbar, dass sowohl BccGlpF Wildtyp, wie auch weitere BccGlpF-Mutanten (BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N) im Vergleich zum *E. coli* GlpF oder auch der nicht veränderten Hefe gleich bzw. leicht schwächer wachsen konnten. Die schwächer wachsenden und somit nicht eindeutig einer Glycerol-Leitfähigkeit zusprechenden BccGlpF-Mutanten sind BccN64A und BccN64D; sichtbar wurde dieses im Vergleich mit der Negativkontrolle, dem

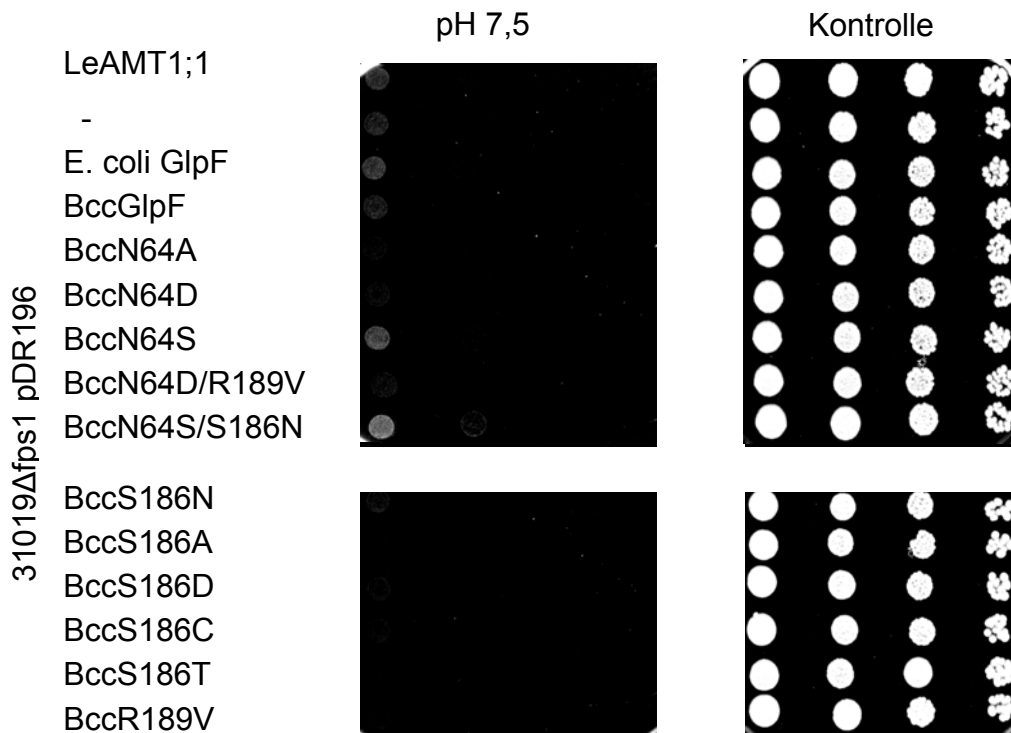


Leerplasmid. Andere BccGlpF-Mutanten (BccN64D/R198V, BccS186A, BccS186D, BccS186C, BccS186T und BccR189V) zeigten ein deutlich schlechteres Wachstum.

### 4.1.3 Untersuchung der Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit

Der Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay als Hefewachstumsassay diente zur Kontrolle der Ammoniak/Ammonium-Aufnahme. Eine Aufnahme der einzigen Stickstoffquelle im Nähr- bzw. Testmedium zeigte sich durch ein verstärktes Wachstum der Hefezellen. Dazu diente die Hefe 31019 $\Delta$ fps1. Als Positivkontrolle diente der Ammoniumtransporter LeAMT1;1 aus der Tomate.





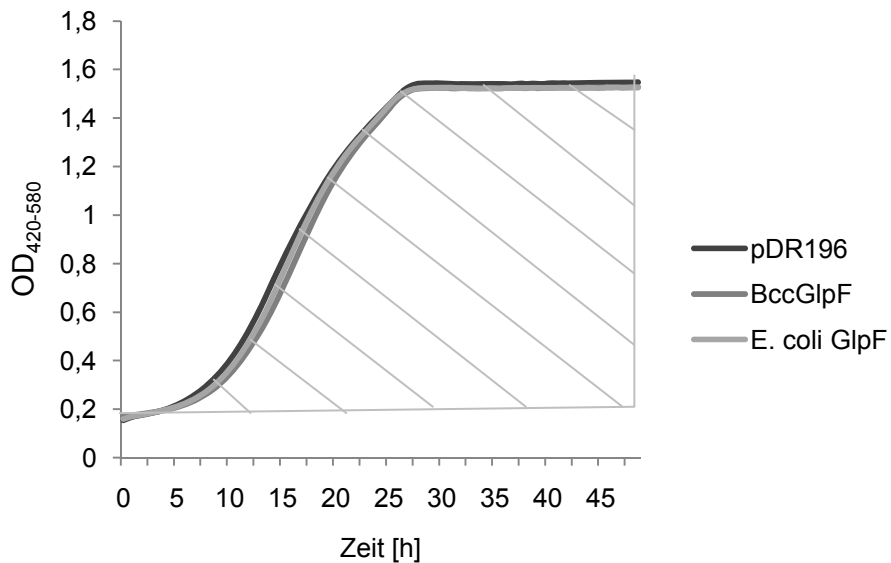
**Abbildung 4.3:** Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay. Gezeigt sind alle *BccGlpF*-Mutanten und Kontrollen exprimiert im Hefestamm 31019 $\Delta$ fps1. Jede Mutante wurde in vier 10fach-Verdünnungsschritten bei verschiedenen pH-Werten bzw. zur Kontrolle auf SD HLK aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 12 Tage.

Auf den Platten mit pH 5,5 war bei wenigen *BccGlpF*-Mutanten ein deutlich verstärktes Wachstum im Vergleich zu der Negativkontrolle zu sehen: *BccGlpF* Wildtyp, *BccN64S*, *BccN64S/S186N* und *BccR189V*. Dieses deutet auf eine Leitfähigkeit für Ammoniak hin. Bei anderen *BccGlpF*-Mutanten war ein lediglich leicht verstärktes Wachstum zu beobachten: *BccS186N*, *BccS186D*, *BccS186C* und *BccS186T*.

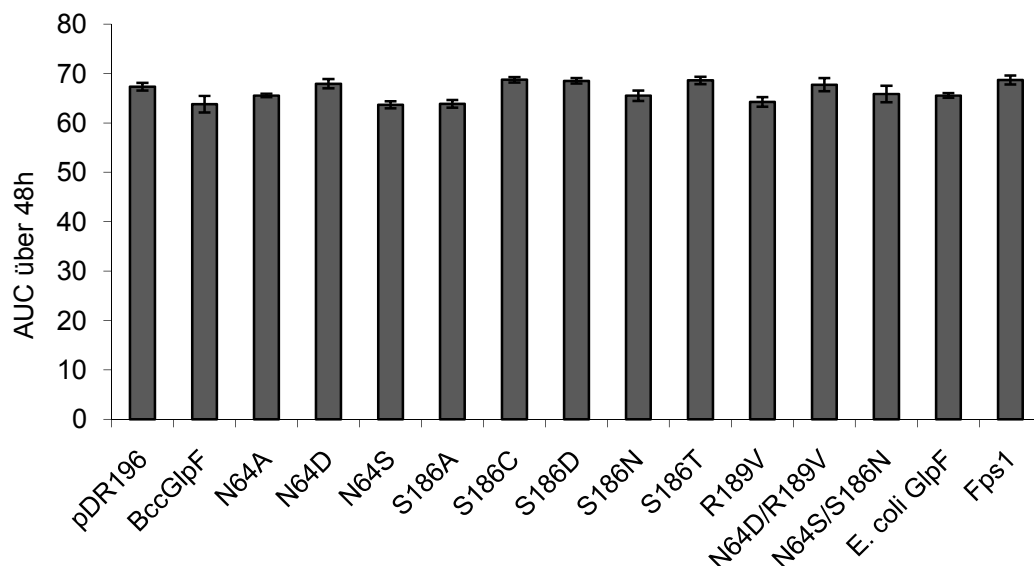
Neben dem Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay auf Hefeagarplatten als Hefewachstumsassay wurde der Test auch in Flüssigkultur durchgeführt. Als Positivkontrolle diente hier neben dem *E. coli* GlpF der nicht veränderte Wildtypstamm 31019, was in den folgenden Graphen unter Fps1 zu finden ist.

Zur Kontrolle des Wachstums wurde der Test neben dem Ammoniumhaltigen Testmedium auch in SD HLK-Medium durchgeführt. Zur Auswertung wurde dabei die AUC, area under the curve, herangezogen, dazu wurden die Wachstumskurven über eine Dauer von 48 h aufgenommen und gegen die optische Dichte aufgetragen. Im Anschluss war es möglich die Gesamt-AUC zu berechnen. Beispielhaft sind in

Abbildung 4.4 drei Wachstumskurven und die Gesamt-AUC einer Wachstumskurve aufgezeigt.



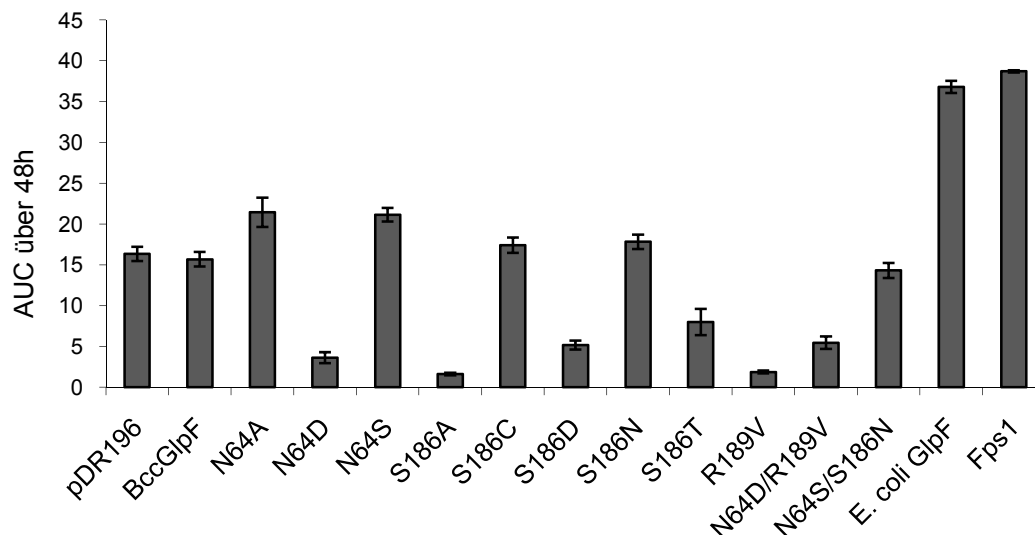
**Abbildung 4.4:** Wachstumskurven des Kontrollassays (in SD HLK-Medium). Gezeigt sind pDR196, BccGlpF und E. coli GlpF exprimiert im Hefestamm 31019Δfps1, aufgezeichnet mit dem Bioscreen über eine Dauer von 48h. Schraffiert dargestellt ist die Gesamt-AUC.



**Abbildung 4.5:** Gesamt-AUC des Kontrollassays (in SD HLK-Medium). Gezeigt sind alle BccGlpF-Mutanten und Kontrollen exprimiert im Hefestamm 31019Δfps1, aufgezeichnet mit dem Bioscreen über eine Dauer von 48h.

Abbildung 4.4 zeigt drei sehr ähnliche Wachstumskurven von mit Leerplasmid pDR196 transformierte 31019 $\Delta$ fps1-Hefe und BccGlpF und *E. coli* GlpF exprimiert in 31019 $\Delta$ fps1-Hefe. Diese Ähnlichkeit der Wachstumskurven ist auch in der Auswertung der Gesamt-AUC in Abbildung 4.5 zu sehen.

Weiterhin macht Abbildung 4.5 deutlich, dass die Kontrollen, BccGlpF Wildtyp und die BccGlpF-Mutanten im SD HLK-Medium gleichmäßig wuchsen.



**Abbildung 4.6:** Gesamt-AUC des Ammoniumaufnahme-Assays. Gezeigt sind alle BccGlpF-Mutanten und Kontrollen exprimiert im Hefestamm 31019 $\Delta$ fps1, aufgezeichnet mit dem Bioscreen über eine Dauer von 48 h.

Das Diagramm (Abbildung 4.6) macht deutlich, dass die beiden gewählten Positivkontrollen ein deutlich verstärktes Wachstum in dem ammoniumhaltigen Medium zeigten im Vergleich zur Negativkontrollen, dem Leerplasmid exprimiert in 31019 $\Delta$ fps1. Bei Betrachtung der BccGlpF-Mutanten wurde sichtbar, dass diese ähnliches bzw. lediglich leicht stärkeres Wachstum gegenüber der Negativkontrolle zeigten (BccGlpF Wildtyp, BccN64A, BccN64S, BccS186C, BccS186N und BccN64S/S186N) bzw. wesentlich schlechteres (BccN64D, BccS186A, BccS186D, BccS186T, BccR189V und BccN64D/R189V).

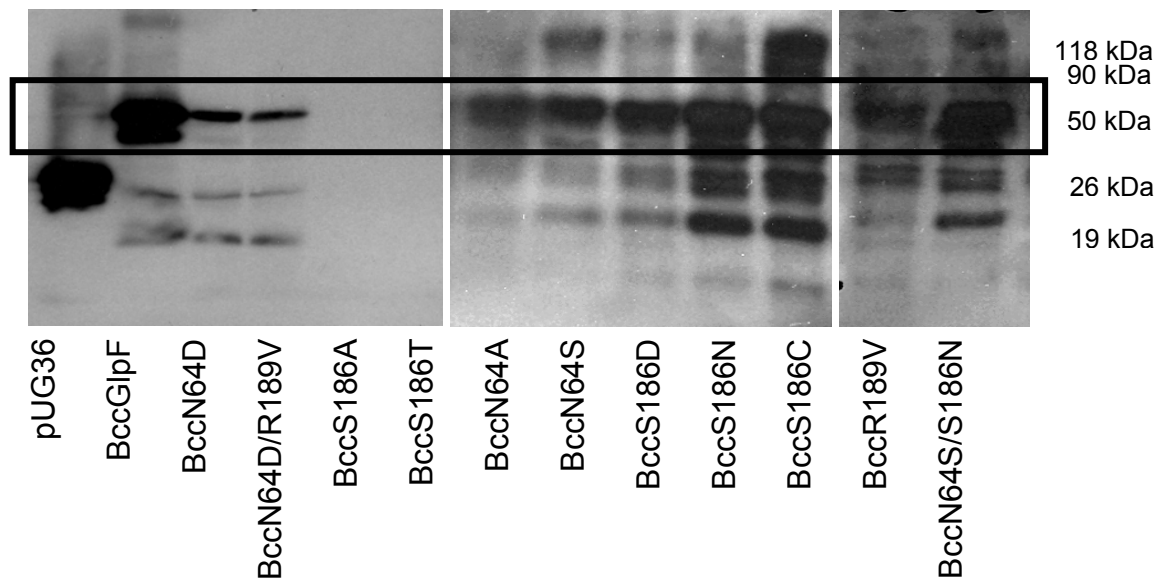
## 4.2 Expressionskontrollen der BccGlpF-Mutanten in *S. cerevisiae*

Mittels Westernblot wurde die Expression der verschiedenen Mutanten in *S. cerevisiae* überprüft. Hierfür diente jeweils der Hefestamm BY4742 $\Delta$ fps1. Nach Isolation der Totalmembranfraktion wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen.

### 4.2.1 Expressionskontrolle durch GFP im pUG36

Die Expressionskontrolle durch einen Vektor mit GFP sollte neben der Detektion auf einem Blot auch eine mikroskopische Detektion ermöglichen. Es war geplant, aufgrund der Verteilung des GFP auf die Verteilung der Aquaglyceroporine innerhalb der Hefezellen schließen zu können. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Eigenfluoreszenz der Hefe bei mikroskopischer Betrachtung die gesamte Bildgebung überdeckte. Da auch die Negativkontrolle, das Leerplasmid pUG36 transformiert in BY4742 $\Delta$ fps1, eine eindeutige Fluoreszenz zeigt, wurde dieser Versuch nicht weiterverfolgt.

Eine Totalmembranpräparation der BccGlpF-Mutanten im Vektor pUG36 wurde durchgeführt und durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht.

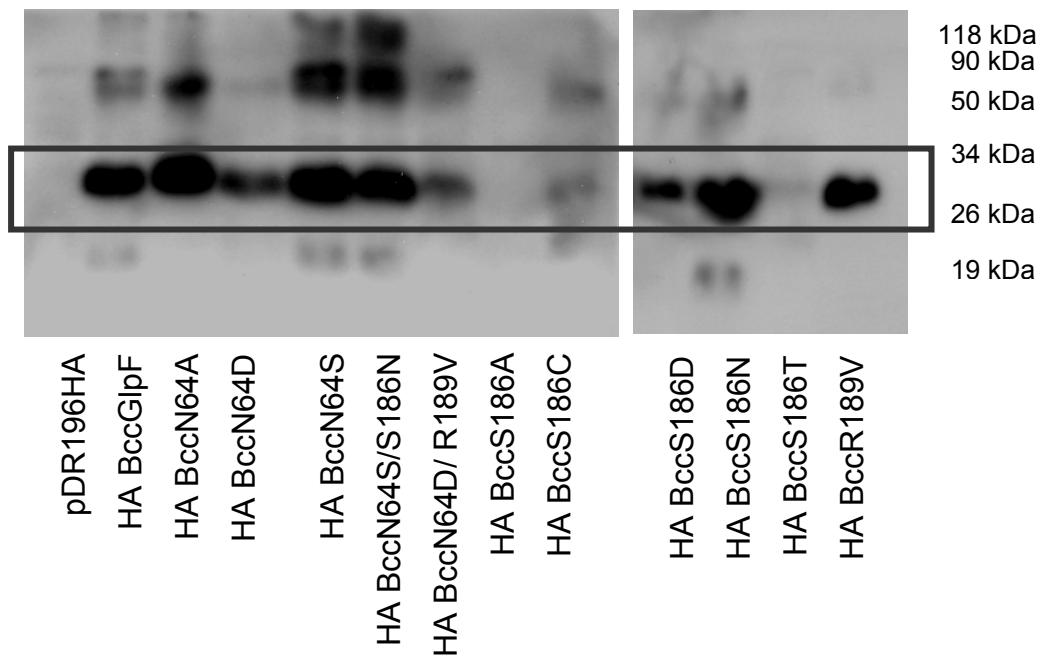


**Abbildung 4.7:** Westernblot der Totalmembranfraktion von *BccGlpF-GFP*-Mutanten-exprimierenden *BY4742Δfps1*-Hefen. Die aufgetragene Konzentration betrug 30 µg Gesamtprotein pro Spur. Detektion durch Antikörper gegen GFP.

Das Signal setzte sich aus der relativen Molekülmasse des GFPs, 26 kDa, und aus der des BccGlpF, 25 kDa, zusammen, was für GFP ein Signal von 26 kDa ergab und für die mit GFP-gekoppelte BccGlpF-Mutanten ein Signal von 51 kDa. Der Blot machte sichtbar, dass nicht alle Mutanten gleichermaßen exprimiert wurden. Eine Expression ähnlich dem BccGlpF Wildtyp gab es bei BccN64A, BccN64S, BccS186D, BccS186N, BccS186C, BccR189V und BccN64S/S186N. Eine schwächere Expression konnte man sehen bei BccN64D und BccN64D/R189V. Und besonders die Nicht-Expression von BccS186A und BccS186T wurde sichtbar.

## 4.2.2 Expressionskontrolle durch HA-Tag im pDR196HA

Die Expression des BccGlpF Wildtyps und aller BccGlpF-Mutanten aus pDR196HA wurde über einen N-terminalen HA-Tag kontrolliert.



**Abbildung 4.8:** Westernblot der Totalmembranfraktion von *BccGlpF*-Mutanten-exprimierenden *BY4742Δfps1*-Hefen. Die aufgetragene Konzentration betrug 10 µg Gesamtprotein pro Spur. Detektion durch Antikörper gegen Hämagglutinin-Tag.

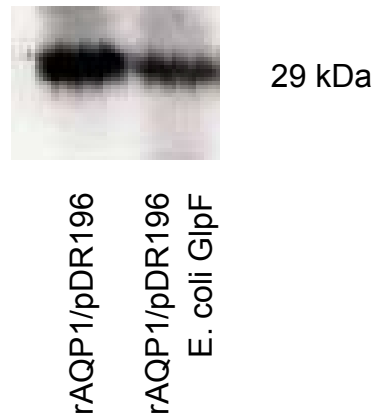
Das Signal setzt sich aus der relativen Molekülmasse des HA-Tags, 2 kDa, und aus der des BccGlpF, 25 kDa, zusammen, was für den Vektor ein nicht mehr auf dem Blot sichtbares Signal ergibt und für die mit HA-Tag-gekoppelten BccGlpF-Mutanten ein Signal von 27 kDa. Der Blot machte sichtbar, dass nicht alle Mutanten gleichermaßen exprimiert wurden (Abbildung 4.8).

Eine Expression ähnlich dem BccGlpF Wildtyp gab es bei BccN64A, BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N und BccR189V. Eine schwächere Expression konnte man sehen bei BccN64D, BccN64D/R189V und BccS186D bzw. noch schwächere bei BccS186C. BccS186A und BccS186T waren praktisch nicht detektierbar.

Das Vorkommen von Dimeren, auch in SDS-PAGE, ist bei Aquaglyceroporinen nicht unüblich (Pavlovic-Djuranovic *et al.*, 2003). Somit lässt sich die obere Bande bei 54 kDa als BccGlpF-Dimer erklären, zum Teil sind ebenso Tetramere erkennbar.

### 4.2.3 Expressionskontrolle bei Cotransformation

Die Expressionskontrolle zur Cotransformation konnte durch einen spezifischen Antikörper gegen rAQP1 durchgeführt werden (Abbildung 4.9).

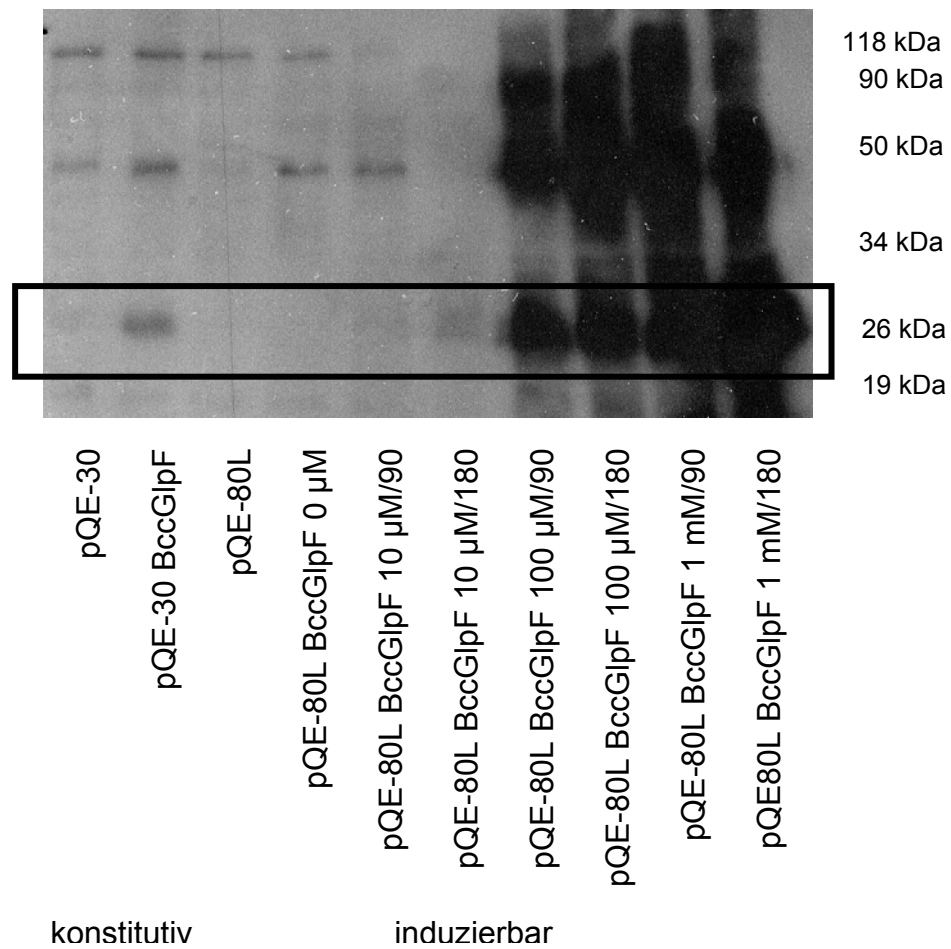


**Abbildung 4.9:** Westernblot der Totalmembranfraktion der Cotransformation von *pMET25comp rAQP1* und *pMET25comp rAQP1/pDR196 E. coli GlpF*, exprimiert im Hefestamm *BY4742Δfps1*. Die aufgetragene Konzentration betrug 10 µg Gesamtprotein pro Spur. Detektion durch Antikörper gegen rAQP1.

### 4.3 Expressionskontrolle in *E. coli*

Zur Expression in *E. coli* wurden ein konstitutiver Vektor, pQE-30, und ein mit IPTG induzierbarer Vektor, pQE-80L, eingesetzt. Die Induktion wurde mit drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen und zu zwei verschiedenen Zeiten verglichen. Induziert wurde mit 10 µM, 100 µM und 1 mM IPTG für jeweils 90 min und 180 min. Zur Kontrolle wurden mit den Leervektoren, pQE-30 und pQE-80L, transformierte Hefe und nicht induzierte Hefe (BccGlpF 0 µM) aufgetragen (Abbildung 4.10).





**Abbildung 4.10:** Westernblot der Totalmembranfraktion von *E. coli* SK46 transformiert mit konstitutiven und induzierbaren pQE-Vektoren mit verschiedenen IPTG-Induktionskonzentrationen und zu verschiedenen Induktionszeiten. Die aufgetragene Konzentration betrug 150  $\mu$ g Gesamtprotein. Detektion erfolgte durch Antikörper gegen His-Tag.

Das Signal setzt sich aus der relativen Molekülmasse des His-Tags, 1 kDa, und aus der des BccGlpF, 25 kDa, zusammen, was für die nur His-Tag-exprimierenden Hefen ein nicht mehr auf dem Blot sichtbares Signal ergibt und für die mit His-Tag-gekoppelten BccGlpF-Mutanten ein Signal von 26 kDa.

Es wurde deutlich, dass BccGlpF in *E. coli* SK46 im pQE-30-Vektor nur schwach exprimiert wurde und bei dem induzierbaren Vektor pQE-80L eine IPTG-Zugabe zu einer starken Expression führte. Hierbei zeigte der Blot die Steigerung der Expression bei einer Erhöhung der IPTG-Konzentration bzw. IPTG-Induktionszeit.

### 4.4 Messungen mit *E. coli* in der Stopped-Flow-Apparatur

Zur Entwicklung der Messungen mit *E. coli* in der Stopped-Flow-Apparatur wurde mit dem Vergleich von SK46 Knockout und MM294 Wildstamm *E. coli* begonnen. Sowohl die Wasserleitfähigkeit wie auch die Glycerol-Leitfähigkeit wurden getestet.

Im Anschluss wurden das BccGlpF in den zwei verschiedenen Vektoren pQE-30 und pQE-80L in *E. coli* SK46 exprimiert vermessen.

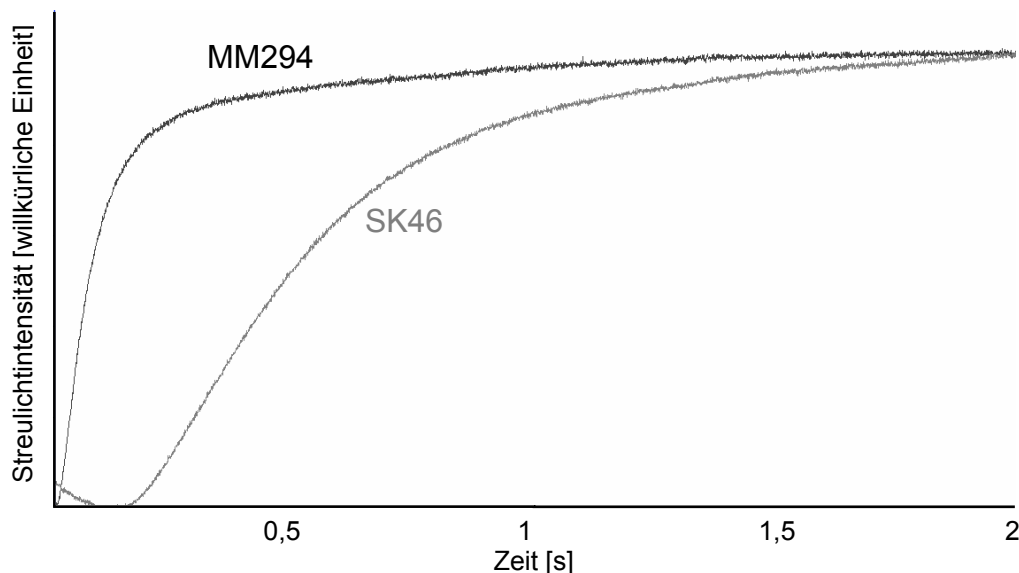
#### 4.4.1 Messungen der Kontrollen

*E. coli* SK46 exprimiert weder AqpZ noch GlpF, das im *E. coli* natürlich vorkommende orthodoxe Aquaporin bzw. Aquaglyceroporin.

Es wurde die Wasserleitfähigkeit und die Glycerol-Leitfähigkeit der beiden *E. coli* Stämme SK46 und MM294 miteinander verglichen (Abbildung 4.11).

##### Messung der Wasserleitfähigkeit

Zur Messung der Wasserleitfähigkeit wurde ein osmotischer Gradient von 500 mOsm eingesetzt.



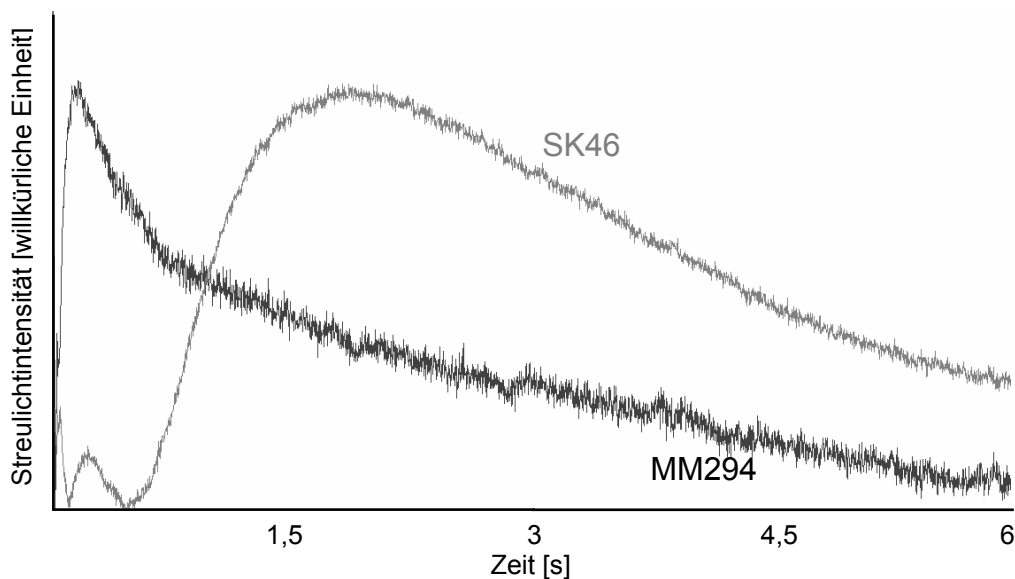
**Abbildung 4.11:** Messung der Wasserleitfähigkeit von *E. coli* bei 20°C. Gezeigt wurden die Kontrollen SK46 (grau) und MM294 (schwarz).

Bei SK46 wurde ein deutlich höherer  $\tau$ -Wert von  $\tau = 0,4$  s bestimmt. Im Gegensatz zu MM294 mit einem  $\tau$ -Wert von  $\tau = 0,1$  s. Somit ist die Funktion des *E. coli* eigenen orthodoxen Aquaporins AqpZ deutlich zu sehen.

Am Anfang der Kurve kann man bei den SK46 Knockout *E. coli* einen leicht späteren Beginn der Steigung beobachten (Bereich von 0 bis 0,2 s). Der Beginn der Reaktion wurde trotzdem bei 0 s angesehen, da SK46 und MM294 unter gleichen Bedingungen in die Küvette gespritzt wurden und somit den gleichen Startpunkt vorwiesen. Die Schwankungen in diesen ersten Millisekunden könnten auf Verwirbelungen in der Küvette zurückzuführen sein, zu sehen in Abbildung 4.11 und 4.12.

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch ein chemischer Gradient von 250 mM Glycerol eingesetzt.



**Abbildung 4.12:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von *E. coli* bei 20°C. Gezeigt wurden die Kontrollen SK46 (grau) und MM294 (schwarz).

Der erste Teil der Kurven, der ansteigende Bereich, beschreibt den Wasseraustritt über die Zellwand, der zweite Teil der Kurve, der abfallende Teil, beschreibt den Glyceroleinstrom durch *E. coli* GlpF vermittelt.

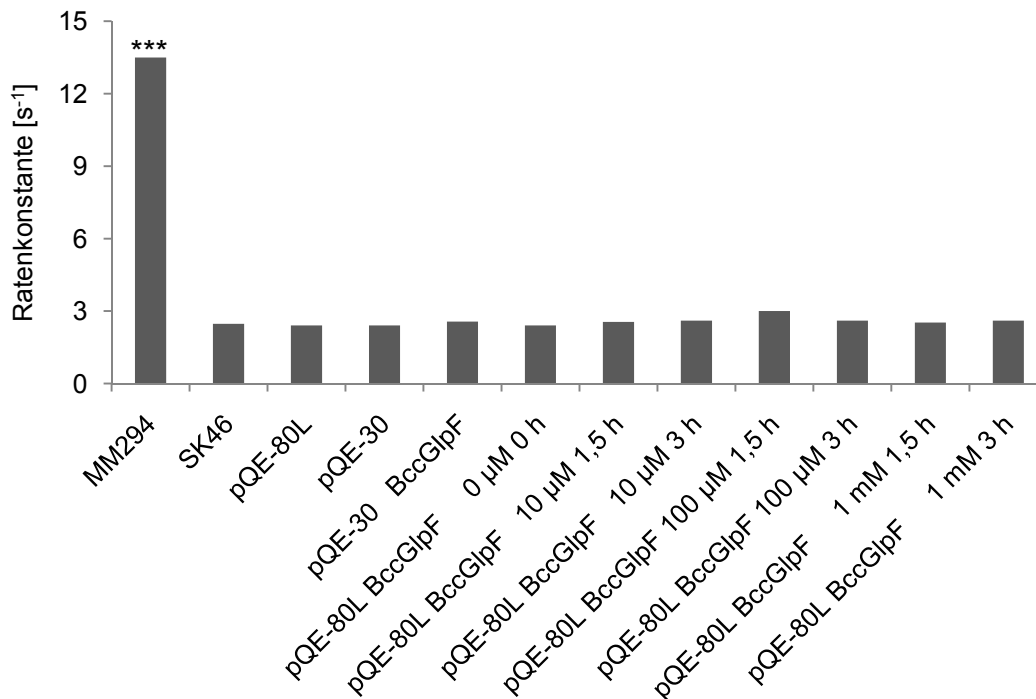
Ein Vergleich der Ratenkonstanten im zweiten Kurventeil zeigt die Unterschiede in der Glycerol-Leitfähigkeit. Bei SK46 wurde eine Ratenkonstante von  $k = 0,2 \text{ s}^{-1}$  und bei MM294 eine Ratenkonstante von  $k = 2,4 \text{ s}^{-1}$  ermittelt.

### 4.4.2 Messungen des BccGlpF

Es wurde die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit des BccGlpF zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Zur Findung der optimalen IPTG-Konzentration und Inkubationszeit wurden im Anschluss an die jeweilige Inkubation die Leitfähigkeiten der jeweiligen Proben vermessen. Es wurden der Wildstamm *E. coli* MM294 als Positivkontrolle und im Knockout *E. coli* SK46 unter verschiedenen Bedingungen exprimiertes BccGlpF vermessen. Dabei wurden zwei verschiedene pQE-Vektoren genutzt: pQE-30 als konstitutiver Vektor und pQE-80L als induzierbarer Vektor.

#### Messung der Wasserleitfähigkeit

Zur Messung der Wasserleitfähigkeit wurde ein osmotischer Gradient von 500 mOsm eingesetzt.

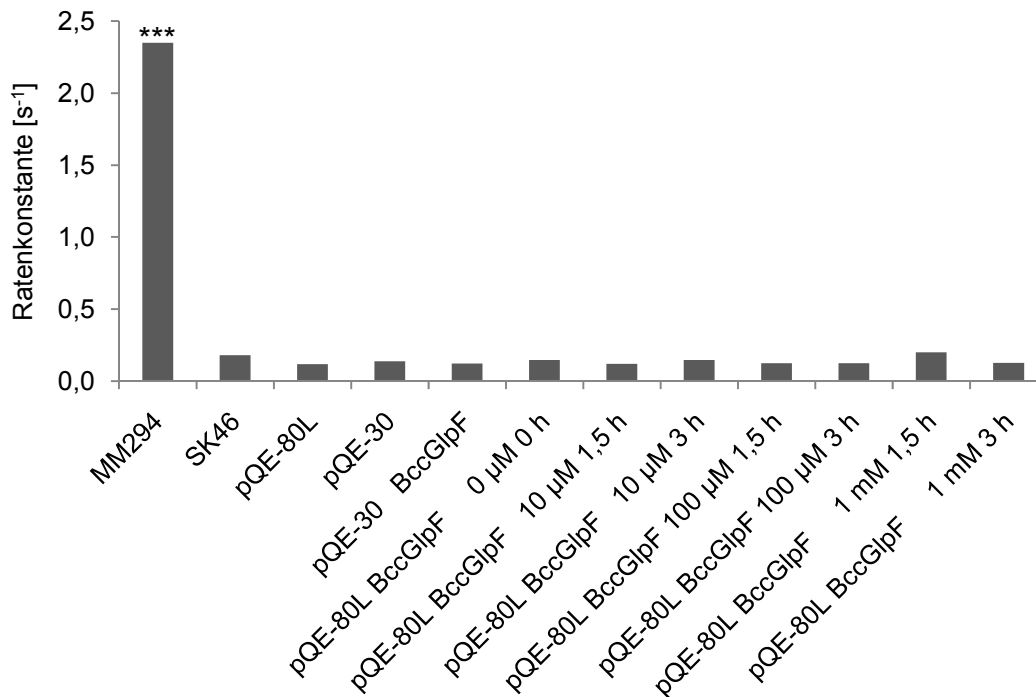


**Abbildung 4.13:** Messung der Wasserleitfähigkeit von *E. coli* bei 20°C. Aufgetragen wurden die Ratenkonstanten der Kontrollen und BccGlpF bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0 μM, 10 μM, 100 μM und 1 mM) und zu verschiedenen Inkubationszeiten (0 h, 1,5 h und 3 h); 7 Einzelkurven pro Messung.

Die verschiedenen Inkubationsstufen brachten keine Veränderungen in der Wasserleitfähigkeit des BccGlpF. Deutlich setzt sich die Positivkontrolle, MM294, von den restlichen Proben ab. Die verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle keine Unterschiede.

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch ein chemischer Gradient von 250 mM Glycerol eingesetzt.



**Abbildung 4.14:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von *E. coli* bei 20°C. Aufgetragen wurden die Ratenkonstanten der Kontrollen und BccGlpF bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0 µM, 10 µM, 100 µM und 1 mM) und zu verschiedenen Inkubationszeiten (0 h, 1,5 h und 3 h); 7 Einzelkurven pro Messung.

Die verschiedenen Inkubationsstufen brachten keine Veränderungen in der Glycerol-Leitfähigkeit des BccGlpF. Deutlich setzt sich die Positivkontrolle, MM294, von den restlichen Proben ab. Die verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle keine Unterschiede.

## 4.5 Messungen von Hefeprotoplasten in der Stopped-Flow-Apparatur

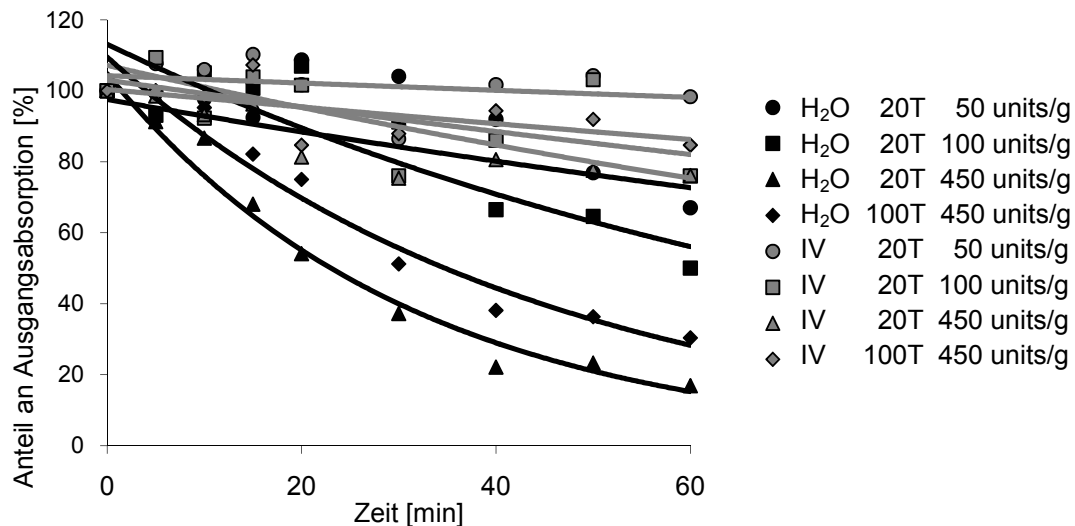
Zur Messung von Hefeprotoplasten in der Stopped-Flow-Apparatur wurde begonnen mit der Ermittlung der Ausgangsparameter, wie Findung der Zymolyase-Konzentration, Größe der Protoplasten und Lagerfähigkeit der Protoplasten. Im Anschluss wurden die Kontrollen bei zwei verschiedenen Temperaturen vermessen. Des Weiteren wurden alle BccGlpF-Mutanten auf Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit untersucht.

### Findung der optimalen Zymolyase-Konzentration

In der Literatur waren verschiedene Angaben zur Zymolyase-Konzentration zu finden: 50 - 100 units/g Nasspellet (Herstellerangaben), 450 units/g (Walworth & Novick, 1987) und 600 units/g (Nakamoto *et al.*, 1991). Auf Überprüfung des letzteren Wertes wurde verzichtet, da die geringeren Konzentrationen schon einen ausreichenden Erfolg brachten. Zur Verfügung standen zwei verschiedene Zymolyase: Zymolyase 20T und Zymolyase 100T, die sich in ihrer Aktivität pro Gramm unterschieden (20T bedeutet 20 000 units/g).

Die ausreichende Konzentration wurde gefunden, indem man Protoplasten mit verschiedenen Zymolasekonzentrationen herstellte und wie unter 3.2.6.3 der Testung von Protoplasten unterzog.

In Wasser platzen die Protoplasten, was zu einer Abnahme der optischen Dichte führt (in Abbildung 4.15 z.B. mit H<sub>2</sub>O 20T 450 units/g beschrieben). Analog dazu verändern sich die Protoplasten in dem sorbitolhaltigen Puffer IV in Bezug auf ihre Größe kaum, und auch die optische Dichte bleibt beinahe unverändert bezogen auf ihren Anfangswert (in Abbildung 4.15 z.B. mit IV 20T 450 units/g beschrieben).



**Abbildung 4.15:** Findung der optimalen Zymolyase-Konzentration und Inkubationszeit. Aufgetragen wurde der Anteil an der Ausgangsabsorption in % gegen die Zeit in min. H<sub>2</sub>O steht für die Zugabe der Protoplasten in Wasser, IV für die Zugabe der Protoplasten in Puffer IV, 20T bzw. 100T für die Inkubation mit der jeweiligen Zymolyase und 50 units/ für die verwendete Zymolyase-Konzentration/g Nasspellet-Gewicht.

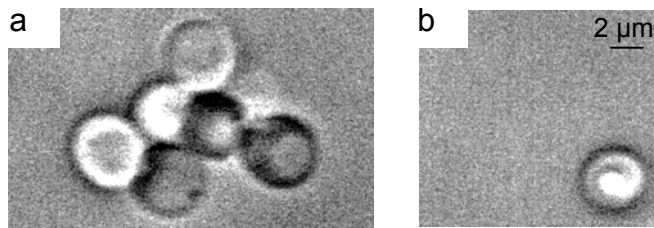
Es wurden beide Zymolyasen getestet: Zymolyase 20T mit 50, 100 und 450 units/g und Zymolyase 100T mit 450 units/g.

Nach Pringle *et al.* kann die Protoplastierung bei Abnahme des Anteils an der Ausgangsabsorption auf 20 - 25% als vollständig angesehen werden kann. Schon bei einer einstündigen Inkubation mit Zymolase 20T und einer Konzentration von 450 U/g Nasspellet konnte die Protoplastierung in diesem Bereich erreicht werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit konnte wie in der Literatur angegeben keine weitere Protoplastierung mit sich ziehen (Pringle *et al.*, 1979).

Für die mit Hefeprotoplasten durchgeführten Messungen wurden Protoplasten bei einer Abnahme auf  $25 \pm 5\%$  verwendet.



### Größe der Protoplasten von *S. cerevisiae*

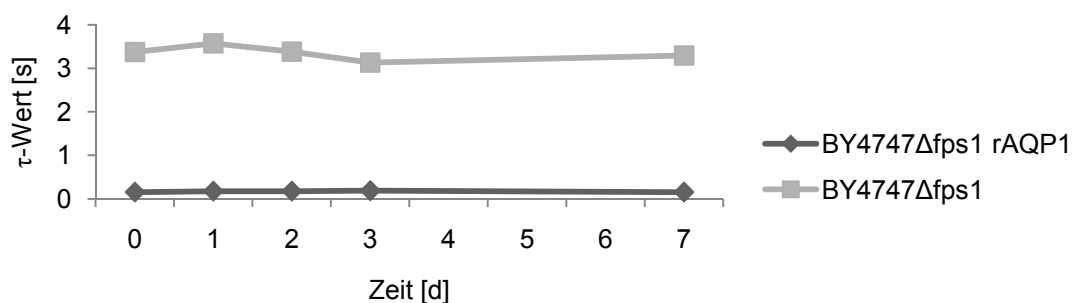


**Abbildung 4.16:** Aufnahme einer Protoplasten-Ansammlung (a) und eines einzelnen Protoplasten (b).

Abbildung 4.16a zeigt eine Ansammlung an Protoplasten, dieses Bild diente der Aussage über die Gleichmäßigkeit der Größenverteilung der Protoplasten untereinander. Abbildung 4.16b zeigt einen vereinzelt Hefeprotoplast, zur Verdeutlichung der Gleichmäßigkeit der Form.

### Lagerfähigkeit der Protoplasten von *S. cerevisiae*

Die Lagerfähigkeit der Hefeprotoplasten bei 6°C wurde untersucht, um die Versuchsdurchführung über mehrere Tage verteilen zu können. Dazu wurden die rAQP1 exprimierende Hefeprotoplasten von BY4742Δfps1 hergestellt und an verschiedenen Tagen vermessen. Im Folgenden wurden die  $\tau$ -Werte der Protoplasten-Messungen über die Zeit von 7 Tagen aufgetragen.



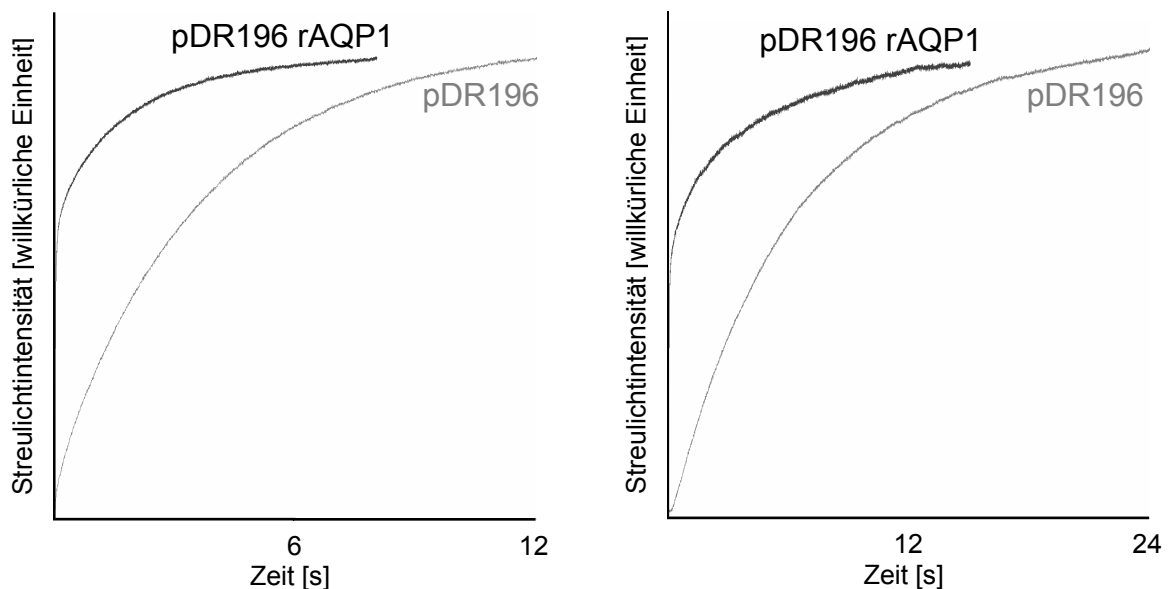
**Abbildung 4.17:** Lagerfähigkeit der Hefeprotoplasten. Aufgetragen wurden die  $\tau$ -Werte von BY4742Δfps1 pDR196 und BY4742Δfps1 pDR196 rAQP1 in s gegen die Zeit in d.

Wie in Abbildung 4.17 gezeigt, zeigten sich über die getestete Zeitspanne von 7 Tagen in den  $\tau$ -Werten keine signifikanten Veränderungen. Eine Lagerung bei 6°C war somit bis zu 7 Tagen möglich.

### 4.5.1 Messungen der Kontrollen

#### Messung der Wasserleitfähigkeit

Zur Messung der Wasserleitfähigkeit wurde ein osmotischer Gradient von 300 mOsm eingesetzt.

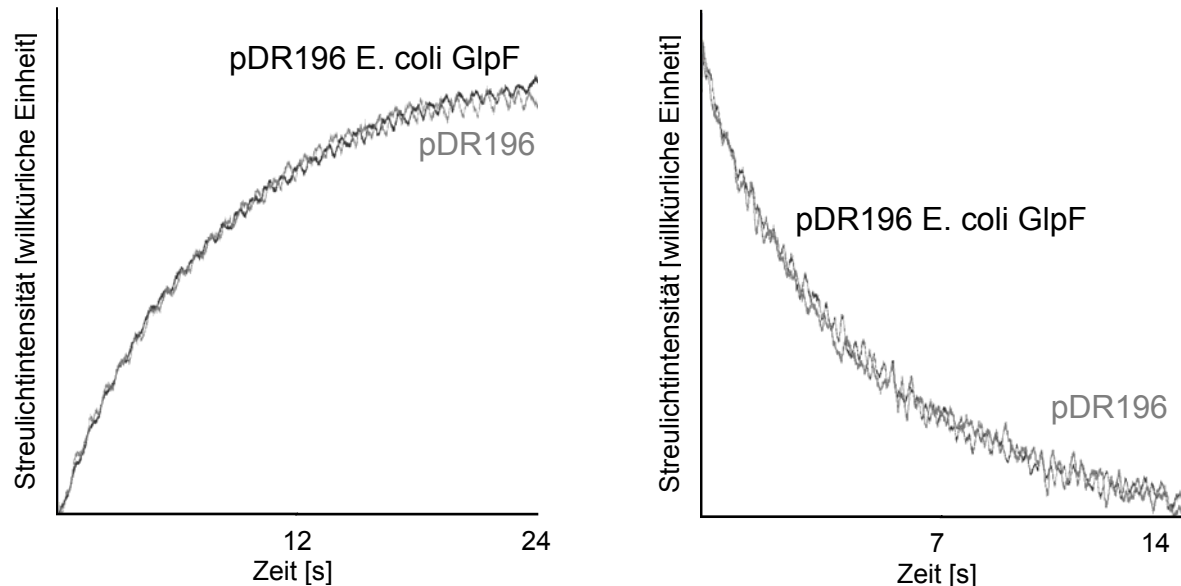


**Abbildung 4.18:** Messung der Wasserleitfähigkeit bei 20°C und 36°C. Gezeigt wurden *BY4742Δfps1 pDR196* (grau) gegen *BY4742Δfps1 pDR196 rAQP1* (schwarz) bei 36°C (linke Abbildung) und 20°C (rechte Abbildung).

Die Messung der Wasserleitfähigkeit zeigte eine deutliche Steigerung der rAQP1 exprimierenden Hefen im Gegensatz zu mit Leerplasmid transformierten Hefen. Die  $\tau$ -Werte lagen bei rAQP1 exprimierenden Hefeprotoplasten bei  $\tau = 0,1$  s und bei den Leerplasmiden bei  $\tau = 2,3$  s. Bei einer Temperaturerhöhung auf 36°C kam es auch zu einem schnelleren Kurvenverlauf:  $\tau = 0,04$  s bei AQP1 und  $\tau = 0,71$  s beim Leerplasmid.

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit in isotonem Medium

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch 600 mM Sorbitol durch 600 mM Glycerol ausgetauscht. Somit lag alleine ein chemischer Glycerolgradient, aber kein osmotischer Gradient vor.



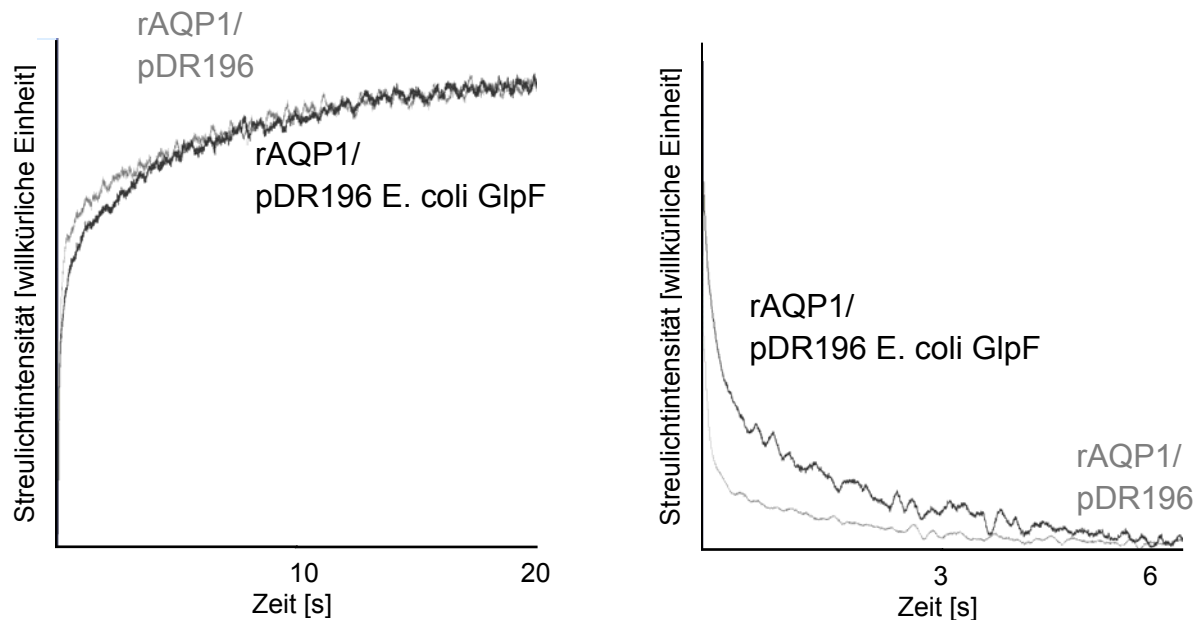
**Abbildung 4.19:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit in isotonem Medium bei 20°C. Gezeigt wurden *BY4742Δfps1* pDR196 (grau) gegen *BY4742Δfps1* pDR196 *E. coli* GlpF (schwarz). Glycerolausstrom (linke Abbildung) und Glyceroleinstrom (rechte Abbildung).

Die Kurven zeigen keinen Unterschied (Abbildung 4.19). Die  $\tau$ -Werte lagen beim Glyceroleinstrom bei pDR196 und pDR196 *E. coli* GlpF jeweils gleich bei  $\tau = 3,8$  s. Auch beim Glycerolausstrom zeigte sich kein Unterschied der Tauwerte, beide Werte lagen bei  $\tau = 1,9$  s.

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit in isotonem Medium bei Coexpression von rAQP1

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch die Cotransformation von rAQP1 neben dem jeweiligen Aquaglyceroporin genutzt. Bei Glyceroleinstrom kommt es zu einem Anstieg der Osmolarität in der Hefezelle. Um den folgenden sekundären Wassereinstrom trotz niedriger Wasserpermeabilität über die Zellmembran zu ermöglichen, diente die zusätzliche Expression des Wasser leitenden AQP1.

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch 600 mM Sorbitol durch 600 mM Glycerol ausgetauscht. Somit lag alleine ein chemischer Glycerolgradient, aber kein osmotischer Gradient vor.

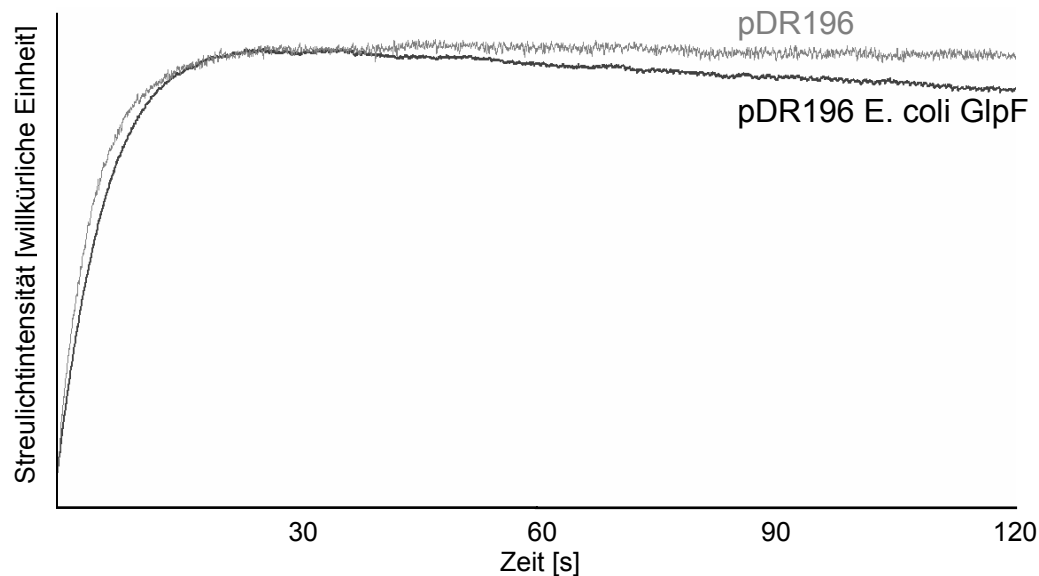


**Abbildung 4.20:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit bei Cotransformation bei 20°C. Gezeigt wurden *BY4742Δfps1 pRS426met rAQP1/pDR196* (grau) gegen *BY4742Δfps1 pRS426met rAQP1/pDR196 E. coli GlpF* (schwarz). Glycerol-ausstrom (linke Abbildung) und Glyceroleinstrom (rechte Abbildung).

In Abbildung 4.20 wurden sowohl der Glyceroleinstrom wie auch der Glycerol-ausstrom bei Coexpression des AQP1 dargestellt. Der Vergleich der *E. coli* GlpF exprimierenden Hefe und der mit Leerplasmid transformierten Hefe zeigte keine deutliche Steigerung des Glyceroleinstroms oder -ausstroms, obwohl für *E. coli* GlpF ein steilerer Kurvenverlauf, welcher den Glyceroltransport widerspiegelt, erwartet wurde. Dieses ist in den aufgenommenen Kurven allerdings nicht zu beobachten und somit konnte die bei Oozyten verwendete Cotransformation zur Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit nicht auf Hefen übertragen werden (Hansen *et al.*, 2002).

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit nach nicht-isotoner Glycerolzugabe

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch ein chemischer und osmotischer Gradient von 300 mM Glycerol eingesetzt.



**Abbildung 4.21:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit bei 20°C. Gezeigt wurden die Schrumpfungs- und anschließende Schwellungskurve von *BY4742Δfps1* pDR196 (grau) gegen *BY4742Δfps1* pDR196 *E. coli* GlpF (schwarz).

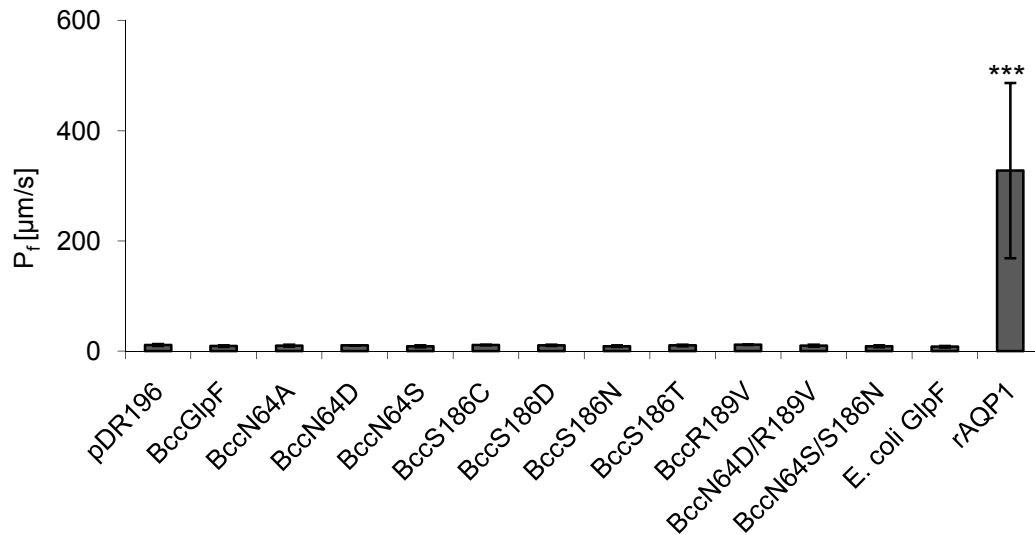
Der erste Teil der Kurven (Abbildung 4.20), ansteigender Bereich, beschreibt den Wasseraustritt über die Zellmembran. Der zweite Teil der Kurve, abfallender Teil, beschreibt den anschließenden langsameren Glyceroleinstrom.

Ein Vergleich der Steigung im zweiten Kurventeil zeigt die Unterschiede in der Glycerol-Leitfähigkeit. Bei *BY4742Δfps1* pDR196 wurde eine Steigung von  $m = 0,2 \text{ ms}^{-1}$  und bei *BY4742Δfps1* pDR196 *E. coli* GlpF eine Steigung von  $m = -0,7 \text{ ms}^{-1}$  ermittelt.

## 4.5.2 Messungen der BccGlpF-Mutanten

### Messung der Wasserleitfähigkeit bei 20°C

Zur Messung der Wasserleitfähigkeit wurde ein osmotischer Gradient von 300 mOsm eingesetzt.

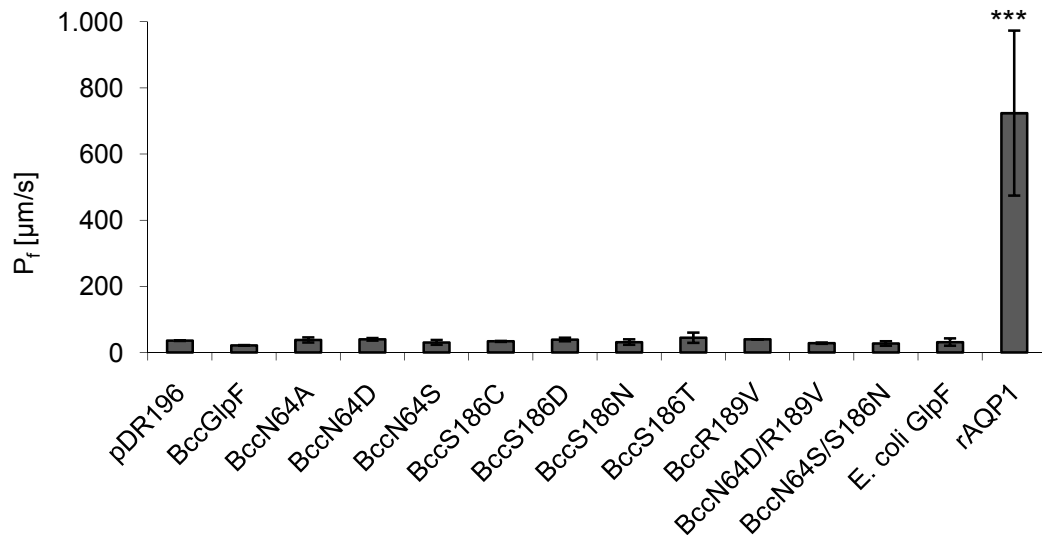


**Abbildung 4.22:** Messung der Wasserleitfähigkeit von Hefeprotoplasten von *BY4742Δfps1* bei 20°C. Gezeigt wurden die  $P_f$ -Werte der BccGlpF-Mutanten sowie der Kontrollen in µm/s (Mittelwert und Spanne); 2 Wiederholungen mit je 9 Einzelkurven.

Die Bestimmung der Wasserleitfähigkeit bei 20°C zeigte eine deutliche Abgrenzung der Negativkontrolle, dem Leerplasmid, und der BccGlpF-Mutanten zu der Positivkontrolle, rAQP1. rAQP1 hatte einen  $P_f$ -Wert von  $328 \pm 159$  µm/s gegen einen  $P_f$  von  $10 \pm 0,2$  µm/s der restlichen getesteten Proben.

### Messung der Wasserleitfähigkeit bei 36°C

Zur Messung der Wasserleitfähigkeit wurde ein osmotischer Gradient von 300 mOsm eingesetzt.

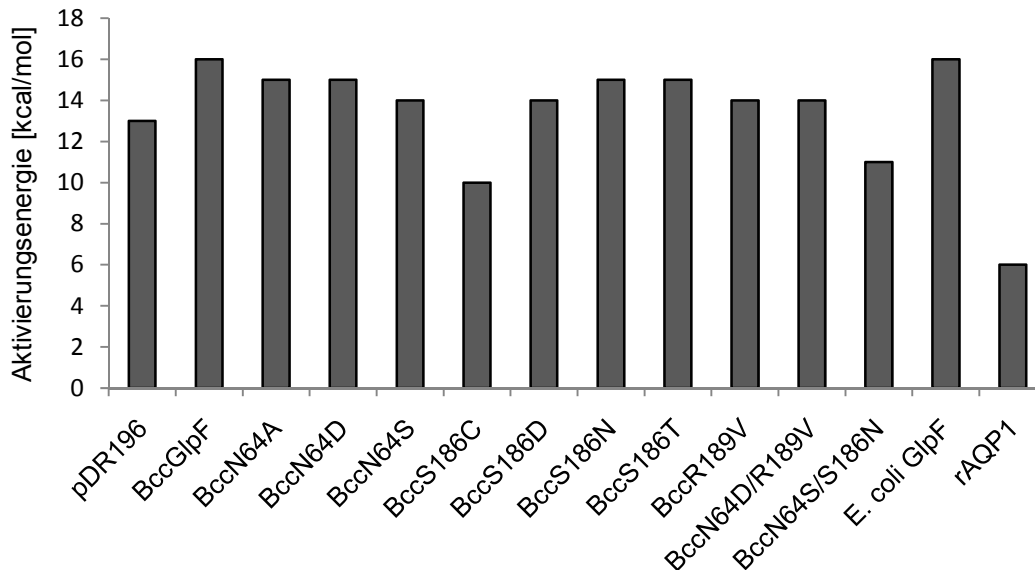


**Abbildung 4.23:** Messung der Wasserleitfähigkeit von Hefeprotoplasten von *BY4742Δfps1* bei 36°C. Gezeigt wurden die  $P_f$ -Werte der *BccGlpF*-Mutanten sowie der Kontrollen in µm/s (Mittelwert und Spanne); 2 Wiederholungen mit je 9 Einzelkurven.

Auch die Bestimmung der Wasserleitfähigkeit bei 36°C zeigte eine deutliche Abgrenzung der Negativkontrolle, dem Leerplasmid, und den *BccGlpF*-Mutanten zu der Positivkontrolle. rAQP1 hatte einen  $P_f$ -Wert von  $724 \pm 249$  µm/s gegen einen  $P_f$  von  $34 \pm 4$  µm/s der restlichen getesteten Proben.

### Arrhenius-Aktivierungsenergie

Die Arrhenius-Aktivierungsenergie wurde über die Darstellung der Messwerte der Wasserleitfähigkeit, welche bei zwei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden, im Arrhenius-Diagramm ermittelt.



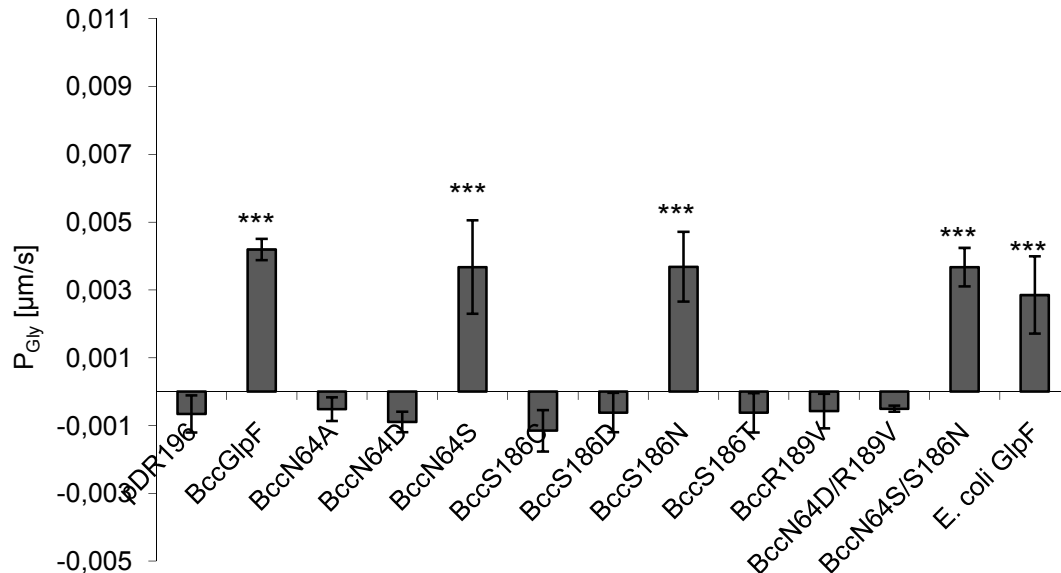
**Abbildung 4.24:** Arrhenius-Aktivierungsenergie. Arrhenius-Aktivierungsenergie der Wasserleitfähigkeit in kcal/mol der BccGlpF-Mutanten sowie der Kontrollen.

Wie in Abbildung 4.24 zu sehen, zeigten die BccGlpF-Mutanten eine ähnlich hohe Arrhenius-Aktivierungsenergie wie die Negativkontrolle (13 kcal/mol), das Leerplasmid. Die Positivkontrolle, das rAQP1, zeigte eine deutlich verringerte Arrhenius-Aktivierungsenergie von lediglich 6 kcal/mol.



### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit bei 20°C

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch ein chemischer und osmotischer Gradient von 300 mM Glycerol eingesetzt.



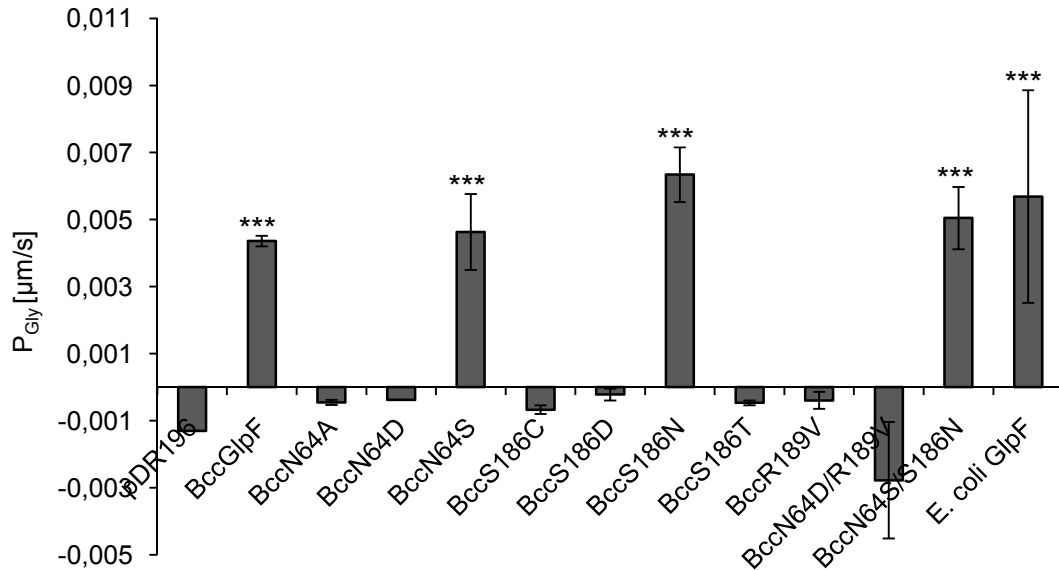
**Abbildung 4.25:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von Hefeprotoplasten von *BY4742Δfps1* bei 20°C. Gezeigt wurden die  $P_{Gly}$ -Werte der *BccGlpF*-Mutanten sowie der Kontrollen in  $\mu\text{m/s}$  (Mittelwert und Spanne); 2 Wiederholungen mit je 7-9 Einzelkurven.

Die Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit bei 20°C zeigte eine deutliche Abgrenzung der Negativkontrolle, dem Leerplasmid, und der Positivkontrolle, dem *E. coli* GlpF (Abbildung 4.25). Die mit Leerplasmid transformierte Hefe zeigte keine Glycerol-Leitfähigkeit.

Vier der *BccGlpF*-Mutanten zeigten Glycerol-Leitfähigkeit: *BccGlpF* Wildtyp, *BccN64S*, *BccS186N* und *BccN64S/S186N*. Die übrigen *BccGlpF*-Mutanten zeigten wie die Negativkontrolle einen  $P_{Gly}$ -Wert der annähernd bei 0 lag und somit keine Glycerol-Leitfähigkeit.

### Messung der Glycerol-Leitfähigkeit bei 36°C

Zur Messung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde in diesem Versuch ein chemischer und osmotischer Gradient von 300 mM Glycerol eingesetzt.

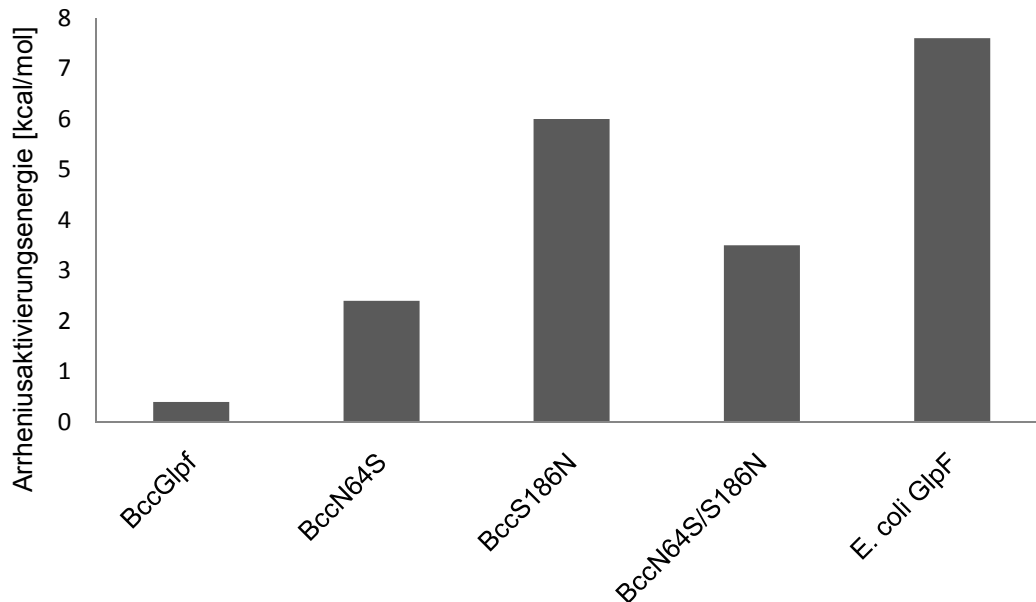


**Abbildung 4.26:** Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von Hefeprotoplasten von *BY4742Δfps1* bei 36°C. Gezeigt wurden die  $P_{Gly}$ -Werte der BccGlpF-Mutanten sowie der Kontrollen in μm/s (Mittelwert und Spanne); 2 Wiederholungen mit je 7-9 Einzelkurven.

Die Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit der BccGlpF-Mutanten bei 36°C zeigte die gleiche Tendenz wie bei 20°C (Abbildung 4.26). Vier der BccGlpF-Mutanten zeigten genau wie die Positivkontrolle, *E. coli* GlpF, Glycerol-Leitfähigkeit, die restlichen BccGlpF-Mutanten zeigten keine Glycerol-Leitfähigkeit.

### Arrhenius-Aktivierungsenergie der Glycerol-Leitfähigkeit

Die Arrhenius-Aktivierungsenergie wurde über die Darstellung der Messwerte der Glycerol-Leitfähigkeit, welche bei zwei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden, im Arrhenius-Diagramm ermittelt.



**Abbildung 4.27:** Arrhenius-Aktivierungsenergie. Arrhenius-Aktivierungsenergie der Glycerol-Leitfähigkeit in kcal/mol der BccGlpF-Mutanten und des *E. coli* GlpF.

Abbildung 4.27 zeigt, dass die Arrhenius-Aktivierungsenergien der Glycerol-Leitfähigkeit des BccGlpF Wildtyps, der drei Glycerol leitenden BccGlpF-Mutanten und des *E. coli* GlpF Werte von 0,4 bis 7,6 kcal/mol annahmen.

## 4.6 Vesikel von *S. cerevisiae*

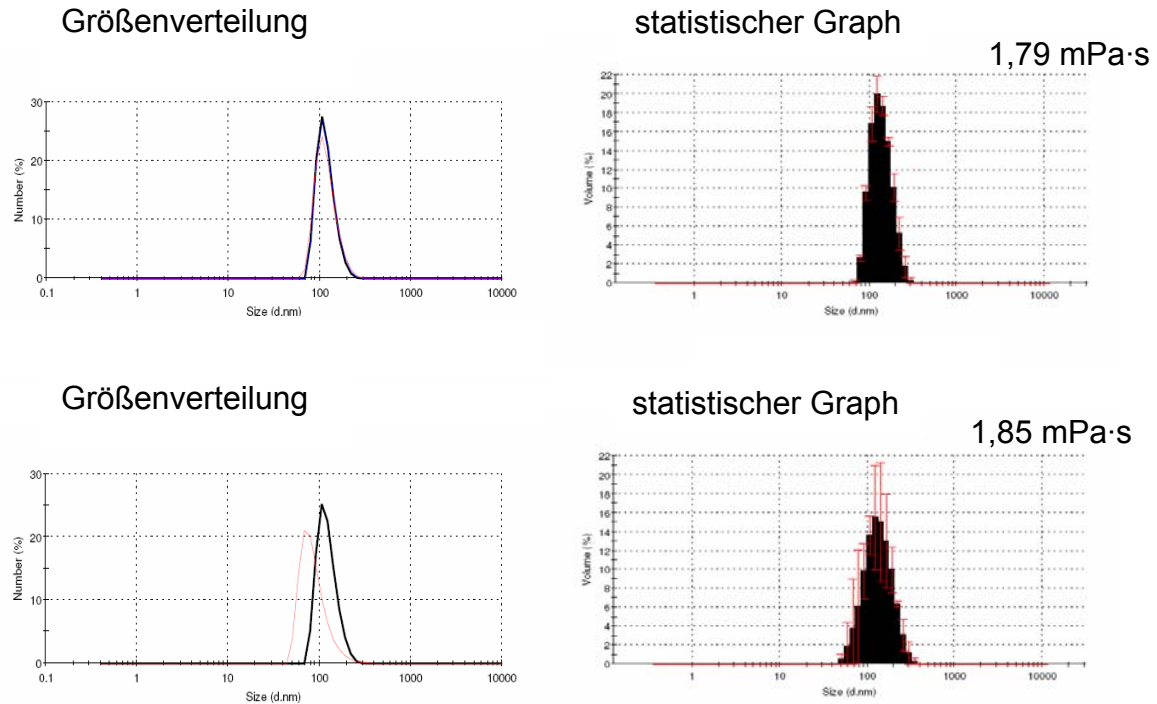
### 4.6.1 Größenbestimmung von Hefevesikeln

Die *S. cerevisiae*-Vesikel der Hefe NY17 wurden wie unter 3.2.6.4 beschrieben hergestellt und im Anschluss daran die Größe der Vesikel bestimmt.

Vor der eigentlichen Größenbestimmung ist es notwendig die Viskosität der Lösung zu bestimmen, somit wurde die Viskosität des Puffers IV, in dem die Vesikel aufgenommen wurden, doppelt bestimmt. Hierbei kam es zu zwei leicht verschiedenen Messwerten. Bei der ersten Messung konnte eine Viskosität von

## 4 Ergebnisse

1,79 mPa·s und bei der zweiten Messung eine Viskosität von 1,85 mPa·s ermittelt werden. Um die Auswirkungen der Ungenauigkeit sehen zu können, wurde die Berechnung der Vesikelgröße auch mit beiden Messwerten für die Viskosität durchgeführt.



**Abbildung 4.28:** Größenverteilung und dazugehörige statistische Graphen der Größenbestimmung der Hefevesikel bei einer Viskosität von 1,79 mPa·s und 1,85 mPa·s.

	1,79 mPa·s	1,85 mPa·s
Mittlerer Teilchendurchmesser	119,0 nm	87,5 nm
Polydispersitätsindex	0,141	0,129

**Tabelle 4.1:** Mittlerer Teilchendurchmesser und Polydispersitätsindex der Hefevesikel bei Viskositätswerten von 1,79 mPa·s und 1,85 mPa·s.

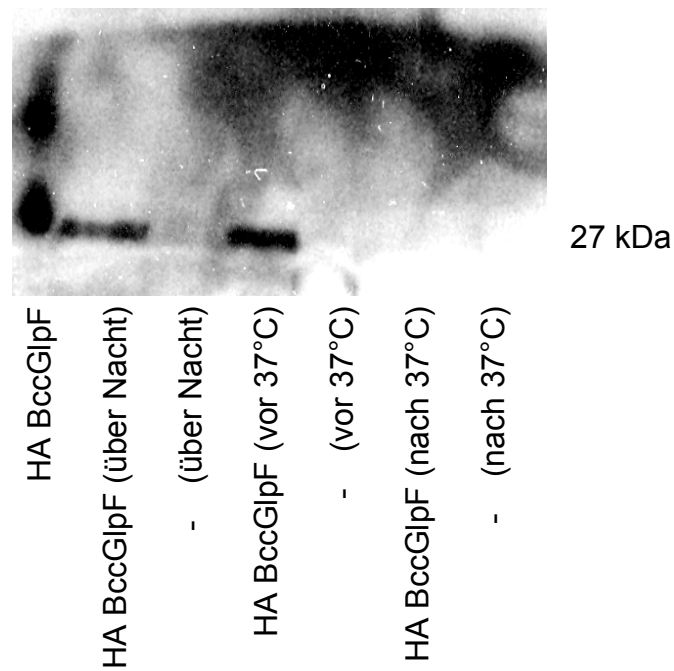
Im Mittelwert ergibt sich eine Vesikelgröße von 103,2 nm. Und entspricht damit dem literaturbekannten Wert von 100 nm (Leizé *et al.*, 1995; Walworth & Novick, 1987). Walworth & Novick isolierten die Vesikel aufgrund ihrer Größe durch eine Gelfiltrationssäule, im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dazu eine Filtration

durch Membranen mit 100 nm Poren durchgeführt. Eigentlich zur Herstellung von Liposomen genutzt, zeigte es hier durch seine schnelle und einfache Handhabung sowie durch seinen geringen Probenverlust einen großen Vorteil und wurde folglich zur Abtrennung größerer Teilchen genutzt. Auch der Polydispersitätsindex entspricht dem einer engen Größenverteilung, bis zu 0,3, somit liegt die Verteilung der Vesikelgrößen in einem engen Fenster.

#### 4.6.2 Expressionskontrolle der Hefevesikel

Im Anschluss an die erfolgreiche Hefevesikelisolation sollte die Expression der Aquaporine in diesen Hefevesikeln gezeigt werden. Dazu wurden die Vesikel auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Eine Detektion der Aquaporine war auf der Stufe der Vesikel allerdings nicht möglich, auf dem Blot war kein Signal sichtbar (Daten nicht gezeigt). Somit wurde die Vesikelpräparation erneut durchgeführt, allerdings mit größeren Volumina, so dass jederzeit eine Probe zurückbehalten werden konnte. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen. Die Hefen wurden über Nacht inkubiert bei 29°C und 180 U/min [Proben: – (über Nacht) und HA BccGlpF (über Nacht)] und am nächsten Tag in einem größeren Volumen auf eine optische Dichte von 2,5 wachsen gelassen (29°C; 180 U/min). Bevor die Proben dem Temperaturshift ausgesetzt wurden, wurden erneut Proben genommen [Proben: – (vor 37°C) und HA BccGlpF (vor 37°C)]. Die letzte Probennahme für diesen Zwischenversuch fand statt nach der Inkubation für 3 h bei 37°C und unter Schütteln bei 180 U/min [Proben: – (nach 37°C) und HA BccGlpF (nach 37°C)].

Zur Kontrolle wurde neben den gewonnenen Proben auch das bereits erfolgreich geblottete BY4742 $\Delta$ fps1 pDR196HA BccGlpF mitaufgetragen.



**Abbildung 4.29:** *Westernblot der verschiedenen Fraktion der Vesikelpräparation der Hefe NY17. Aufgetragen wurden 4,6 units OD<sub>600</sub> pro Spur. Detektion erfolgte durch Antikörper gegen HA-Tag.*

Bei Betrachtung des Blots (Abbildung 4.29) sah man die Positivkontrolle mit einem deutlichen Signal bei 27 kDa. Ein Signal trat auch bei der über Nacht-Probe und bei der vor dem Temperaturshift gewonnenen Probe auf. Bei der nächsten Probengewinnung, nach der Inkubation für 3 h bei 37°C war das Signal nicht mehr zu sehen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Wachstumsassays mit *S. cerevisiae*

Für erste Funktionalitätstests dienten die Wachstumsassays von *S. cerevisiae*. Die BccGlpF-Mutanten zeigten schon beim Test auf Methylamin-Leitfähigkeit je nach Veränderung ihrer Aminosäuren unterschiedliche Eigenschaften. Für fehlendes Wachstum auf Methylamin-haltigen Agarplatten könnten drei Gründe denkbar sein. Zum ersten könnten die Mutanten keine Methylamin-Leitfähigkeit besitzen und durch die Kumulation des toxischen Methylamins am Wachstum gehindert werden. Zum zweiten wäre es möglich, dass die Aquaglyceroporine geladenes Methylammonium besser leiten könnten als ungeladenes Methylamin, was zu einer Erhöhung der Methylamin-Konzentration in der Hefe führen würde. Zum dritten wäre denkbar, dass die Mutanten durch ihre veränderten Aminosäuren so verändert wurden, dass eine korrekte Faltung und Porenbildung nicht mehr möglich ist und somit gar keine Expression stattfindet.

Unverändertes Wachstum auf den Methylamin-haltigen Agarplatten wurde gezeigt von BccGlpF Wildtyp und BccN64A, BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N, BccS186D, BccS186C, sowie BccR189V. Somit konnten diese veränderten BccGlpF-Varianten zum einen erfolgreich exprimiert werden und zum anderen besitzen sie auch eine Methylamin-Leitfähigkeit. Andere BccGlpF-Mutanten zeigten diese Funktion der Methylamin-Leitfähigkeit nur in geringerem Maße (BccN64D) oder gar nicht (BccN64D/R198V, BccS186A und BccS186T). Deutlich zu sehen war auch das bessere Wachstum bei einem höheren pH-Wert von pH 6,5, und somit geringerem Methylamin-Konzentrationsgefälle, von BccGlpF Wildtyp, BccN64S, BccS186N und BccN64S/S186N.

Es zeigte sich, dass ein Austausch sowohl im ersten NPI- wie auch im zweiten SPA-Motiv gegen Asparagin oder Serin ohne Verlust der Methylamin-Leitfähigkeit möglich war. Überraschend war die Entdeckung, dass auch weitere Austausche ohne Einschränkung der Methylamin-Leitfähigkeit möglich waren. Wie der Austausch des Asn64 nach Alanin und der Austausch des Ser186 nach Aspartat und Cystein. Auch eine Veränderung in der ar/R-Region von Arginin zu Valin war möglich.

Bei dem Glycerol-Efflux-Assay wurde sichtbar, dass sowohl BccGlpF Wildtyp, wie auch weitere BccGlpF-Mutanten (BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N) im Vergleich zum *E. coli* GlpF oder auch der nicht veränderten Hefe gleich bzw. etwas

schwächer wachsen konnten und somit eine Glycerol-Leitfähigkeit zeigten. Nicht eindeutig eine Glycerol-Leitfähigkeit zugesprochen werden konnten den BccGlpF-Mutanten BccN64A und BccN64D. Andere BccGlpF-Mutanten (BccN64D/R198V, BccS186A, BccS186C, BccS186D, BccS186T und BccR189V) zeigten ein deutlich schlechteres Wachstum, was darauf schließen lässt, dass es sich bei den zuletzt genannten BccGlpF-Mutanten um keine Glycerol leitenden Kanäle handelt oder durch die Veränderung der Aminosäuren keine funktionellen Aquaglyceroporine entstanden sind.

Bei dem Ammoniak/Ammonium-Aufnahme-Assay zeigte sich bei geringerem pH-Wert, dass einige BccGlpF-Mutanten ein deutlich verstärktes Wachstum zu der Negativkontrolle zeigten: BccGlpF Wildtyp, BccN64S, BccN64S/S186N und BccR189V, dieses lässt auf eine Ammoniakpermeabilität schließen. Bei anderen BccGlpF-Mutanten war ein leicht verstärktes Wachstum zu beobachten: BccS186N, BccS186D, BccS186C und BccS186T, dieses lässt auf eine schwächere Ammoniak-Leitfähigkeit schließen. Bisher wird allen Glycerol leitenden Aquaporinen auch eine Ammoniak-Leitfähigkeit zugesprochen, diese Aufnahme ist pH-abhängig (Zeuthen *et al.*, 2006). Trotz einer Zuordnung zur Ammoniak-Leitfähigkeit der Aquaglyceroporine aufgrund des Aminosäuren-Sequenzvergleiches ist die Testung darauf bisher bei wenigen Aquaglyceroporinen durchgeführt worden. So auch beim *E. coli* GlpF, welchem eine Permeabilität für Ammoniak theoretisch zugesprochen wird, aber praktisch überprüft hat es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Arbeitsgruppe (Litman *et al.*, 2009). Der durchgeführte Hefewachstumsassay in Flüssigkultur zeigte keine Leitfähigkeit des BccGlpF Wildtyps und der BccGlpF-Mutanten, und stand somit im Widerspruch zu den durchgeführten Hefewachstumsassay auf Agarplatten. Somit bedürfte der sich noch im Aufbau befindende Test auf Ammoniak-Permeabilität in Flüssigkultur einer weiteren Etablierung. Darauf wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da die Ermittlung der Ammoniak-Leitfähigkeit mit den vorhandenen Testsystemen auf Hefeagarplatten gezeigt werden konnte. Bei der Interpretation der Ammoniak-Permeabilität des BccGlpF Wildtyps und der BccGlpF-Mutanten wurde daher der Wachstumstest auf Agarplatten herangezogen. Ein Stopped-Flow-Verfahren zur Messung auf Ammoniak/Ammonium-Leitfähigkeit ist gerade in der Endphase der Etablierung in unserem Arbeitskreis.

Die Mutation BccS186N hatte trotz gleicher Expressionslevel im Vergleich zum BccGlpF Wildtyp eine Einschränkung der Ammoniak-Leitfähigkeit zur Folge. Somit



schien das Serin im BccGlpF überraschenderweise bei der Ammoniak-Leitfähigkeit eine wichtige Funktion zu übernehmen, die durch das Asparagin nicht vollständig übernommen werden konnte, die genauen Mechanismen der  $\text{NH}_3$ -Aufnahme sind noch nicht vollständig geklärt und daher ließe sich hier nur spekulieren (Litman *et al.*, 2009). Insgesamt ein ungewöhnlicher Befund, da die auf Ammoniak-Leitfähigkeit getesteten Aquaglyceroporine im Allgemeinen hochkonservierte NPA-Motive besitzen (Litman *et al.*, 2009). Weiterhin war auch die Doppelmutation BccN64S/S186N von einer Reduktion der Ammoniakpermeabilität nicht betroffen.

Die Mutante BccR189V zeigte ein ähnliches Wachstum wie BccGlpF Wildtyp. Eine Vergrößerung im Durchmesser und Veränderung der Polarität der ar/R-Region führte schon bei vorherigen Mutanten in unserem Arbeitskreis zu einer Verbesserung der  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Leitfähigkeit (Beitz *et al.*, 2006a). Ein weiterer Eingriff in die Filterregionen des BccGlpF hatte eine deutliche Verringerung oder vollständiges Verlorengehen der Ammoniak-Permeabilität zur Folge.

BccGlpF Wildtyp zeigte sich anhand der Hefeplattenwachstumstest als ein sowohl Methylamin, Ammoniak, wie auch Glycerol leitendes Aquaglyceroporin. Dies bestätigte somit die Einteilung nach verschiedenen Proteinstrukturelementen in die Klasse der Aquaglyceroporine.

BccN64D/R189V, BccS186A und BccS186T zeigten keine der getesteten Leitfähigkeiten und somit stellte sich die Frage, ob diese Veränderungen im Protein überhaupt toleriert wurden.

Der durchgeführte Hefewachstumsassay im Bioscreen C-Gerät zeigte gelungene Positivkontrollen, aber ein deutliches Abheben der verschiedenen BccGlpF-Mutanten von der Negativkontrolle, dem Leerplasmid, war nicht zu beobachten. Somit war eine quantitative Aussage zur Ammoniak-Leitfähigkeit durch den Bioscreen C nicht möglich.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Hefewachstumsassays des BccGlpF und der BccGlpF-Mutanten ist in Tabelle 5.1 zu finden.

	Methylamin- Leitfähigkeit	Glycerol- Leitfähigkeit	Ammoniak- Leitfähigkeit
BccGlpF	++	++	++
BccN64A	++	-	-
BccN64D	+	-	-
BccN64S	++	++	++
BccS186A	-	-	-
BccS186C	+	-	-
BccS186D	+	-	-
BccS186N	++	++	-
BccS186T	-	-	-
BccN64S/S186N	++	++	++
BccN64D/R189V	-	-	-
BccR189V	++	-	++

**Tabelle 5.1:** Übersicht über die Ergebnisse der Wachstumsassays mit *S. cerevisiae*. Gezeigt sind die Methylamin-, Glycerol- und Ammoniak-Leitfähigkeit aller BccGlpF-Mutanten. ++ = sehr gute Leitfähigkeit, + = gute Leitfähigkeit, - = keine Leitfähigkeit.

## 5.2 Expression der BccGlpF-Mutanten

Die Expression der BccGlpF-Mutanten wurde in zwei verschiedenen Vektoren durchgeführt. Die Expression zusammen mit GFP, dem grün fluoreszierenden Protein, sollten die BccGlpF-Mutanten neben der Expressionskontrolle auch der mikroskopischen Detektion und besonders der Bestimmung der Lokalisation zugänglich machen. Dieses ist bei Aquaporinen und Proteinen in Zelllinien und Hefen erfolgreich durchgeführt worden (Wu *et al.*, 2009; Beitz *et al.*, 2006b). Dieser Plan musste allerdings verworfen werden als sich herausstellte, dass Hefen eine zu hohe

Eigenfluoreszenz besitzen und somit die Lokalisierung der BccGlpF-Mutanten innerhalb der Hefe leider nicht möglich war.

Die Isolierung der Totalmembranfraktion der BccGlpF-Mutanten im pUG36, mit GFP, zeigte allerdings schon erste Unterschiede in der Expression des durch Aminosäurenaustausch veränderten BccGlpF. Diese Unterschiede zeigten sich auch in der zweiten Aufarbeitung der Totalmembranfraktion der BccGlpF-Mutanten in einem anderen Vektor, dem pDR196HA mit einem HA-Tag, und somit bei der Detektion durch einen anderen Antikörper. BccGlpF Wildtyp, BccN64A, BccN64S, BccN64S/S186N, BccS186N, BccS186D und auch BccR189V zeigten eine vergleichbare Signalstärke. Nur BccN64D und BccN64D/R189V zeigten eine verringerte Signalstärke. Die verringerte Expression der Asparagin- nach Aspartat-Mutation ist analog zu der Verringerung der Expression bei gleichem Aminosäuren-Austausch im rAQP1 (Wu *et al.*, 2009). Außerdem konnte das Nicht-Wachsen auf den Methylamin-Agarplatten von BccS186A durch fehlende Expression erklärt werden. BccS186T zeigt auf den Methylamin-Agarplatten auch kein Wachstum, allerdings war in der Expressionskontrolle von BccS186T im Vektor pDR196HA eine schwache Expression detektierbar. BccN64D/R189V, welches keine der getesteten Leitfähigkeiten zeigte, wurde exprimiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des Asn64 zum Alanin und Serin toleriert wurde. Außerdem wurde eine Veränderung des Ser186 zum Aspartat, zum Cystein und zum Asparagin toleriert. Lediglich eine Veränderung des Ser186 zum Alanin und somit der Wegfall der funktionellen Gruppe war nicht möglich. Besonders die Kombination von Asparagin- zu Serin-Resten in der NPI/SPA-Filterregion schien in jeglicher Variante im BccGlpF möglich zu sein.

Es blieb immer noch die Frage, warum das sonst üblicherweise in Aquaporinen hochkonservierte Asparagin überhaupt gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht ist? In der Expressionskontrolle waren dieser und weitere Austausche unbedenklich möglich. Überraschenderweise ist der Austausch mit Sicht auf die Expression vom Asparagin zum Alanin möglich, ein Austausch des Serins zum Alanin wurde nicht toleriert. Durch den Wegfall jeglicher funktioneller Gruppen an der Position des zweiten NPA-Motives scheint es zu einer Fehlfaltung des Aquaporins zu kommen und somit war keine Expression mehr möglich. Erst die Veränderung in der zweiten Halbhelix scheint sich durch eine Nichtexpression und somit Auswirkung auf das gesamte Protein bemerkbar zu machen. Die Veränderung zum Alanin im ersten

NPA-Motiv dagegen wurde toleriert, eine korrekte Faltung und Expression ist an dieser Stelle auch mit einem Alanin statt eines Asparagins möglich.

Die Expressionskontrolle in *E. coli* zeigt eine Expression des BccGlpF Wildtyps sowohl bei dem konstitutiven Vektor pQE-30, wie auch nach Induktion durch IPTG bei dem induktiven Vektor pQE-80L. Somit wurde der BccGlpF Wildtyp in *E. coli* SK46 exprimiert und stand den Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur zur Verfügung.

### 5.3 Entwicklung der Stopped-Flow-Messungen

Die Stopped-Flow-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Dazu war es nötig auch verschiedene Messorganismen auszutesten. Die erste Variante stellte dabei die Versuche mit *E. coli* dar. Dazu wurden erst *E. coli* SK46 mit seinem Wildstamm MM294 bezüglich deren Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit miteinander verglichen. Der Vergleich zeigte deutlich, dass die Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit mit der durchgeführten Versuchsanordnung ermittelbar wurde und die Auswirkung des fehlenden *E. coli* AqpZ und des *E. coli* GlpF nachweisbar war (Hubert *et al.*, 2005). Dabei ergab der Wasserausstrom erwartungsgemäß ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zum Glyceroleinstrom. Dieses liegt an der wesentlich schnelleren Leitung von Wasser durch die Pore im Vergleich zum größeren Glycerol (Borgnia & Agre, 2001).

Nach den positiven Ergebnissen der Kontrolle wurden zur Findung des geeigneten Vektors sowohl der konstitutive Vektor pQE-30 wie auch der induktive Vektor pQE-80L für die Versuche herangezogen. Die Expression zeigte, dass in beiden Vektoren BccGlpF Wildtyp exprimiert werden konnte. Eine stärkere Expression, wie bei höheren IPTG-Konzentrationen und längerer Induktionszeit, steht nicht automatisch für eine höhere Anzahl funktionstüchtiger Proteine (Cymer & Schneider, 2010).

Das BccGlpF wurde nach verschiedenen IPTG-Konzentrationen und Induktionszeiten in *E. coli* SK46 in der Stopped-Flow-Apparatur vermessen. Allerdings waren die aus der Messung der Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit ermittelten Ratenkonstanten des BccGlpF Wildtyps im Bereich der Negativkontrolle und weit entfernt von der Positivkontrolle, dem *E. coli* Wildstamm MM294.

Die Messung mit *E. coli* in der Stopped-Flow-Apparatur wurde bisher nur für das Aquaglyceroporin *Lactococcus lactis* durchgeführt (Hubert *et al.*, 2005). Aufgrund der ausbleibenden positiven Ergebnisse und langwierigen Versuche zur Findung der optimalen Induktionsbedingungen zur Expression des BccGlpF wurden die Versuche mit *E. coli* in der vorliegenden Arbeit nicht weiter fortgeführt.

Ein weiterer Ansatz war die Messung mit Protoplasten von *S. cerevisiae* BY4742 $\Delta$ fps1. Zur Herstellung von Protoplasten wurde zum einen die optimale Inkubationsmenge an Zymolyase 20T und die optimale Inkubationszeit ermittelt.

Die hergestellten Protoplasten wurden mikroskopiert und deren Größe von 4-5  $\mu$ m entsprechend den Literaturangaben konnte bestätigt werden (Bertl & Kaldenhoff, 2007). Zur Vereinfachung der Versuchsdurchführung und längeren Nutzung der hergestellten Protoplasten wurde die Lagerfähigkeit dieser bei 6°C untersucht. Es konnten gezeigt werden, dass eine Lagerung der Protoplasten von bis zu 7 Tagen unbedenklich ist und zu keinem Funktionsverlust der Hefeprotoplasten führte.

Die Wasserleitfähigkeit für Aquaglyceropore in Protoplasten von *S. cerevisiae* konnte bisher von keiner Arbeitsgruppe gezeigt werden, auch wenn die Wasserleitfähigkeit dieser Aquaglyceropore in anderen Testsystemen bereits bekannt war. Ein Beispiel hierfür ist das *Plasmodium falciparum* Aquaglyceroporin PfAQP. Hansen *et al.* konnten eine gute Wasserleitfähigkeit für PfAQP in *Xenopus laevis* Oozyten zeigen, der Versuch der Arbeitsgruppe um Hohmann, diese auch in den Hefeprotoplasten der *S. cerevisiae* zu reproduzieren, war jedoch nicht möglich (Hansen *et al.*, 2002; Hedfalk *et al.*, 2008). Zur Messung der Wasserleitfähigkeit an Hefeprotoplasten wurde in den bisherigen Studien keine Stopped-Flow-Messung verwendet, sondern ein rein spektroskopisches Verfahren, wobei die optische Dichte über eine Zeit von 120 s in bestimmten Zeitintervallen aufgenommen wurde. Unser Bestreben lag jedoch darin, über ein wesentlich sensibleres System, die Stopped-Flow-Technik, diese bisher nicht detektierbare Wasserleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen zu ermitteln. Denn bei orthodoxen Aquaporinen sind Messungen mit der Stopped-Flow-Apparatur bereits erfolgreich angewendet worden (Bertl & Kaldenhoff, 2007; Soveral *et al.*, 2006).

Die Bestimmung der Wasserleitfähigkeit wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen: 20°C und 36°C durchgeführt. Begonnen wurden die Messungen der Wasserleitfähigkeit der Hefeprotoplasten mit Kontrollen, verglichen wurden die Negativkontrolle BY4742 $\Delta$ fps1 pDR196 und die Positivkontrolle BY4742 $\Delta$ fps1

pDR196 rAQP1. Durch den Wasseraustritt und somit das Schrumpfen der Protoplasten konnte der Permeabilitätskoeffizient für Wasser, kurz  $P_f$ -Wert, bestimmt werden. Der  $P_f$ -Wert zeigte für das Leerplasmid bei 20°C einen Wert von  $P_f = 11 \mu\text{m/s}$  und bei 36°C einen Wert von  $P_f = 35 \mu\text{m/s}$ . rAQP1 dagegen zeigt einen 20 - 30mal höheren Wert von  $P_f = 320 \mu\text{m/s}$  bei 20°C und  $P_f = 720 \mu\text{m/s}$  bei 36°C. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten  $P_f$ -Werte von rAQP1 bei 20°C waren damit vergleichbar zu bereits veröffentlichten Werten, die  $P_f$ -Werte bei 36°C lagen leicht erhöht (Wu *et al.*, 2009). Die aus zwei verschiedenen Temperaturen ermittelte Arrhenius-Aktivierungsenergie zeigte für das Leerplasmid 13 kcal/mol und für rAQP1 6 kcal/mol. Diese ermittelten Arrhenius-Aktivierungsenergien entsprachen einer erhöhten Aktivierungsenergie ( $E_a > 10 \text{ kcal/mol}$ ) durch einfache Diffusion über die Lipidmembran im Falle der Negativkontrolle, dem Leerplasmid, und einer niedrigen Aktivierungsenergie ( $E_a < 5 \text{ kcal/mol}$ ), welche der freien Diffusion von Wasser in Lösung entspricht. Somit wurde in Hefeprotoplasten zum einen der Wasserdurchtritt über die Lipidmembran der Negativkontrolle bestätigt und zum anderen der Wasserausstrom durch das rAQP1, der Positivkontrolle.

Die Wasserleitfähigkeit durch Hefeprotoplasten konnte somit in unserem Arbeitskreis für orthodoxe Aquaporine am Beispiel des rAQP1 etabliert und gezeigt werden.

Die Wasserleitfähigkeit des *E. coli* GlpF wird unterschiedlich interpretiert. Manche Arbeitsgruppen schreiben dem *E. coli* GlpF keine Wasser leitende Eigenschaft zu (Calamita, 2000; Maurel *et al.*, 1994), andere Forschungsgruppen sprechen von einer geringen Wasserleitfähigkeit (Stroud *et al.*, 2003; Borgnia & Agre, 2001). Bei unseren Versuchen zeigte *E. coli* GlpF keine Wasserleitfähigkeit, was aber somit nicht eindeutig einer fehlenden Wasserleitfähigkeit zugesprochen werden kann. Es wäre wünschenswert, die Wasserleitfähigkeit mit einem anderen Osmolyt als Sorbitol zu wiederholen.

PfAQP besitzt im Schleife C ein Glutamat, welchem durch Mutationen eine entscheidende Rolle zum Wassertransport zugeschrieben werden konnte (Beitz *et al.*, 2004). Ein Vergleich der Aminosäuren zeigt an dieser Position bei *E. coli* GlpF ein Serin (Beitz, 2006). Ein durchgeführtes Alignment mit dem *Burkholderia* Aquaglyceroporin BccGlpF Wildtyp zeigte an dieser Stelle ein Cystein, welches strukturverwandter mit dem Serin des *E. coli* GlpF ist und somit eine schlechtere Wasserleitfähigkeit erwarten ließe.

Die Glycerol-Leitfähigkeit bei Aquaglyceroporinen mittels der Stopped-Flow-Technik wurde bisher in künstlich hergestellten Proteoliposomen untersucht, jedoch nicht in Hefeprotoplasten (Borgnia & Agre, 2001). Andere Testsysteme zur Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit sind Messungen mit *Xenopus laevis* Oozyten oder Messungen mit  $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ -markiertem Glycerol und anschließender Szintillationsmessung (Hansen *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 1994). Zur Ermittlung der Glycerol-Leitfähigkeit gab es drei aus der Literatur bekannte Ansätze: 1. Glyceroleinstrom und -ausstrom in isotonem chemischen Gradienten. 2. Isotoner Glyceroleinstrom und -ausstrom verstärkt durch Cotransformation eines orthodoxen Aquaporins, auch bei der Messung mit Oozyten und Proteoliposomen angewendet (Beitz *et al.*, 2006a; Borgnia & Agre, 2001). 3. Glyceroleintritt bei vorangegangenen Wasseraustritt, was einen biphasischen Kurvenverlauf zur Folge hat und Anwendung bisher nur bei Messungen mit *E. coli* fand (Hubert *et al.*, 2005). Zur Ermittlung der geeignetsten Messverfahren zur Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit wurden alle drei Verfahren getestet.

Nur die dritte getestete Methode brachte Erfolg. Die bisher nur bei *E. coli* angewendete Messmethode konnte auf Hefeprotoplasten übertragen werden. Der erste Teil der Kurven, ansteigender Bereich, beschreibt dabei den Wasseraustritt über die Zellmembran. Der zweite Teil der Kurve, abfallender Teil, beschreibt den anschließenden langsameren Glyceroleinstrom. Zur Auswertung wurde der zweite Kurventeil herangezogen. Eine negative Steigung zeigt dabei den Glyceroleinstrom an, was sich in einem langsamen Schwellen der Hefeprotoplasten zeigt und somit einer Abnahme des optischen Signals. Ein Vergleich der Steigungen in diesem zweiten Teil des Kurvenverlaufs zeigte die Unterschiede in der Glycerol-Leitfähigkeit. Es gelang somit eine Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von in Hefeprotoplasten exprimierten orthodoxen Aquaporinen und eine Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit von in Hefeprotoplasten exprimierten Aquaglyceroporinen zu etablieren. Für die folgenden Messungen des BccGlpF Wildtyps und dessen Mutanten wurden die entwickelten Methoden angewendet.

## 5.4 Leitfähigkeiten der BccGlpF-Mutanten in der Stopped-Flow-Apparatur

Zur Bestimmung ihrer Leitfähigkeiten wurden alle exprimierten BccGlpF-Mutanten herangezogen: BccGlpF Wildtyp, BccN64A, BccN64D, BccN64S, BccS186C, BccS186D, BccS186N, BccS186T, BccN64S/S186N, BccN64D/R189V und BccR189V.

Die Wasserleitfähigkeit der Aquaglyceroporinen konnte wie bei anderen Veröffentlichungen zu diesem Thema nicht gezeigt werden (Pettersson *et al.*, 2006). Zur Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeit wurde der ermittelte biphasische Kurvenverlauf herangezogen.

Die Auswertung der Steigung des Glyceroleintritt-Kurvenverlaufs zeigte bei BccGlpF Wildtyp, BccN64S, BccS186N und BccN64S/S186N eine deutliche Glycerol-Leitfähigkeit bei 20°C von  $P_{\text{Gly}} = 0,0029 - 0,0042 \mu\text{m/s}$  im Vergleich zur Negativkontrolle von  $P_{\text{Gly}} = -0,0006 \mu\text{m/s}$ . Bei 36°C erhöhten sich die  $P_{\text{Gly}}$ -Werte erwartungsgemäß. BccGlpF, BccN64S, BccS186N und BccN64S/S186N zeigten bei 36°C eine Glycerol-Leitfähigkeit von  $P_{\text{Gly}} = 0,0044 - 0,0057 \mu\text{m/s}$  im Vergleich zur Negativkontrolle, dem Leerplasmid, von  $P_{\text{Gly}} = -0,0013 \mu\text{m/s}$ . Diese in der Stopped-Flow-Apparatur bestimmte Glycerol-Leitfähigkeit bestätigte die Hefewachstumsassays. Bei dem Glycerol-Efflux-Assay zeigten BccGlpF Wildtyp und der Asparagin nach Serin-Austausch (BccN64S), Serin nach Asparagin (BccS186N) und die Kombination beider (BccN64S/S186N) im Vergleich zum *E. coli* GlpF ähnliches Wachstum und somit schon eine Glycerol-Leitfähigkeit an. Die noch im Hefewachstumsassay nicht ganz eindeutigen Ergebnisse anderer BccGlpF-Mutanten, BccN64A und BccN64D, konnten in der Stopped-Flow-Apparatur deutlich einer fehlenden Glycerol-Leitfähigkeit zugeordnet werden. Die übrigen, schon bei dem Glycerol-Efflux-Assay als nicht Glycerol leitende Aquaglyceroporine, beschriebenen BccGlpF-Mutanten (BccN64D/R189V, BccS186C, BccS186D, BccS186T und BccR189V) bestätigten ihre fehlende Glycerol-Leitfähigkeit.

Im Vergleich zu anderen Testsystemen zeigte die ermittelte Soluleitfähigkeit für Glycerol geringere Werte. In Oozyten, mit Cotransformation eines Wasser leitendes Aquaporins zeigten sich für ein Glycerol leitendes Aquaporin Werte von  $P_{\text{Gly}} = 0,026 \mu\text{m/s}$  (Beitz *et al.*, 2006a). Bei Proteoliposomen zeigten sich sogar Werte von  $P_{\text{Gly}} = 0,25 \mu\text{m/s}$  ohne gleichzeitige Expression von einem Wasser leitenden Aquaporin bzw. bei vorhandener Coexpression noch höhere Werte von



$P_{\text{Gly}} = 1,2 \mu\text{m/s}$  (Borgnia & Agre, 2001). Zur Ermittlung der  $P_{\text{Gly}}$ -Werte wurden in dieser Arbeit die von Beitz *et al.* für die *Xenopus laevis* Oozyten genutzte Formel auf Hefeprotoplasten abgestimmt, dazu wurde unter anderem das Verhältnis Volumen/Oberfläche auf das der Hefeprotoplasten angepasst. Die von Borgnia und Agre genutzte Formel bedient sich weiterhin einer mathematischen Kalkulationssoftware. Somit kann besonders der letzte Wert nicht direkt zum Vergleich der mit Hefeprotoplasten berechneten  $P_{\text{Gly}}$ -Werte genutzt werden.

Die hier ermittelten  $P_{\text{Gly}}$ -Werte der BccGlpF-Mutanten zeigten stark schwankende Werte auf, wodurch auch die ermittelten Arrhenius-Aktivierungsenergien starke Schwankungen zeigten. Die Hefeprotoplasten können durchaus für die Bestimmung der Glycerol-Leitfähigkeiten herangezogen werden können, eine weitere Optimierung des Systems wäre aber wünschenswert.

Die Veränderung in der ar/R-Region BccR189V zeigte einen Verlust der Glycerol-Leitfähigkeit. Zur Passage des Glycerols durch die ar/R-Region muss eine höhere Energiebarriere als an anderen Stellen des Kanals überwunden werden (Hub *et al.*, 2009; Hénin *et al.*, 2008). Daher lag die Überlegung nahe, mit einer Vergrößerung dieser Region und Veränderung der Polarität dem Glycerol den Eintritt zu erleichtern und einen verstärkten Glycerolstrom verfolgen zu können. Natürlicherweise ein Valin statt des hochkonservierten Arginins in der ar/R-Region besitzt *Toxoplasma gondii*, ein Aquaglyceroporin mit guter Wasser- und Glycerol-Leitfähigkeit, TgAQP (Pavlovic-Djuranovic *et al.*, 2003). Die Übertragung des natürlich vorkommenden Austausches im TgAQP auf BccGlpF war somit nicht möglich. Dieses lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Arg195 im BccGlpF für die Glycerolaufnahme essentiell ist.

## 5.5 Auswirkungen der Veränderungen im BccGlpF

Die Veränderung verschiedener Aminosäuren im BccGlpF sollte Aufschluss über die Funktionen der NPA-Region und zum Teil die der ar/R-Region geben.

Mit Sicht auf die Expression des Proteins wurde eine Veränderung des Asn64 zum Alanin und Serin genauso toleriert, wie eine Veränderung des Ser186 zum Aspartat, zum Cystein, zum Threonin und zum Asparagin. Lediglich eine Veränderung des Ser186 zum Alanin und somit der Wegfall der funktionellen Gruppe war nicht möglich.

An der ersten Position der NPA-Motive scheinen sämtliche Kombinationen von Asparagin und Serin möglich zu sein und zu keinem Wirkungsverlust der Glycerol-Leitfähigkeit zu führen. Ein weiterer Eingriff, Veränderung des NPA-Motives zu weiteren Aminosäuren, sowie Veränderung der ar/R-Region ging mindestens mit einem Verlust der Glycerol-Leitfähigkeit einher.

Somit lässt sich die Frage nach der Funktion des Serins nicht mit seiner Einzigartigkeit und Unaustauschbarkeit erklären. Ein Austausch zum Asparagin führte schließlich zu keiner Veränderung der Glycerol-Leitfähigkeit, die Wasserleitfähigkeit lässt sich noch nicht abschließend in die Diskussion mit einbeziehen.

Um das Auftreten des ungewöhnlichen Serins im NPA-Motiv des BccGlpF möglicherweise erklären zu können, kann man weitere Aquaporine zum Vergleich heranziehen. Danach ist eine Veränderung des NPA-Motives nicht unüblich, aber eher selten. Ein Austausch an der zweiten Position, dem Prolin, oder der dritten Position, dem Alanin, ist noch relativ gewöhnlich und von einigen Aquaporinen bekannt (Yakata *et al.*, 2007; Ishibashi, 2006a). Ein Austausch des Asparagins dagegen ist zu den seltenen Veränderungen zu zählen. Seit einiger Zeit postulieren einige Arbeitsgruppen eine besondere Form der Aquaporine, die sie zu einer neuen Gruppe zählen wollen, den S-Aquaporinen, wobei S für Superfamily, SIP-like oder/und subcellular steht (Ishibashi, 2006b). Diese Gruppe umfasst alle Aquaporine, die aber nur noch eine Ähnlichkeit von 20% auf Proteinebene aufzeigen, besonders in Hinsicht auf die spezifischen Merkmale der Aquaporine (Nozaki *et al.*, 2008). Außerdem kommen die S-Aquaporine vor allem intrazellulär vor, Ishibashi vermutet eine evolutionäre Weiterentwicklung der früher intrazellulären Kanäle zu den jetzt bekannten meist membranständigen Aquaporinen (Ishibashi, 2006a). Zwei Vertreter der S-Aquaporine aus der Familie der Nematoden besitzen ein SPL-Motiv anstatt dem NPA-Motiv. Wenn auch die Veränderung in dem ersten der beiden NPA-Motive zu finden ist, zeigt es doch den möglichen Austausch des Asparagins zum Serin bei einfachen Lebewesen. Ein Ansatz, welches das Serin im bakteriellen BccGlpF von evolutionären Gründen her erklären könnte oder durch Genmutation entstanden, wobei das Serin, trotz seines Unterschieds zum Asparagin, die Funktionen übernehmen und sich somit evolutionär durchsetzen konnte. Weiterhin ist zu beachten, dass Asparagin und Serin beide dazu neigen Helices zu unterbrechen und mit dem Prolin Helix-cap-Strukturen hervorrufen können und somit können diese

zwei verschiedenen Aminosäuren die gleiche Funktion übernehmen, was auch das Serin an dieser hochkonservierten Stelle des NPA-Motives möglich macht.

Erst kürzlich gab es eine Veröffentlichung zur Veränderung im NPA-Motiv. Die Arbeit befasst sich genauer gesagt nicht mit einer Veränderung der NPA-Motive, sondern mit ihrer vollständigen Deletion des ersten oder des zweiten NPA-Motives, sowie der Kombination beider Deletionen. Alle drei Möglichkeiten werden exprimiert und zeigen Wasserleitfähigkeit (Jiang, 2009).

Auch der Blick auf die ar/R-Region zeigte spannende Auswirkungen der Veränderungen einzelner Aminosäuren. Der Austausch des Arginins zum unpolaren Valin (BccR189V) sollte zu einer Veränderung der Polarität und besonders der Vergrößerung des äußeren Selektivitätsfilters führen. Deutlich wurde das Verschwinden der Glycerol-Leitfähigkeit bei einem Austausch des Arginins zum Valin an dieser Stelle. Im *E. coli* GlpF bilden Trp48 und Phe200 in der ar/R-Region eine hydrophobe Seite, woran der Alkylrücken des hindurchtretenden Glycerols gedrückt wird. Weiterhin bilden Gly191 und Phe200 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und das Arg206 dient als zweifacher Wasserstoffbrücken-Donor (Fu *et al.*, 2000). Somit scheint diese Bereitstellung von Wasserstoffbrückenbindungen des Arg189 im BccGlpF essentiell für die Glycerol-Leitfähigkeit zu sein und nicht durch eine vergrößerte Pore kompensierbar. Im BccGlpF bilden vermutlich Trp44, Gly174, Tyr183 und Arg189 die ar/R-Region. Die ar/R-Region ähnelt damit zum einen dem *E. coli* GlpF (Trp, Gly, Phe und Arg), aber auch dem AQP3 (Phe, Gly, Tyr und Arg) und AQP7 (Phe, Gly, Tyr und Arg) (Litman *et al.*, 2009; Walz *et al.*, 2009).

Auch durch eine weitere Neutralisierung des zweiten Selektivitätsfilters, dem NPA-Motiv, neben der vergrößerten Eingangspore durch die BccGlpF-Mutante BccN64D/R189V kam es zu keinem Rückerlangen der Glycerol-Leitfähigkeit.

Die Mutanten BccN64A und BccS186A hätten erwarten lassen, nach dem uneingeschränkt möglichen Austausch von Serin und Asparagin, dass sich auch diese gleich verhalten. Doch schon das Wachstum des BccN64A im Gegensatz zum Nichtwachsen des BccS186A auf den Methylamin-Agarplatten zeigte ein deutlich unterschiedliches Ergebnis. Dieses wurde durch die erfolgreiche Expression von BccN64A und die fehlende Expression von BccS186A weiter gestärkt. Bei der Mutante BccN64A stehen sich in der Kanalverengung ein Alanin und ein Serin gegenüber, bei BccS186A stehen sich Asparagin und Alanin gegenüber. Bei Betrachtung der möglichen Wasserstoffbrücken fallen somit bei BccN64A zwei der

insgesamt drei möglichen Wasserstoffbrücken weg und bei BccS186A nur eine der drei möglichen. Dieses würde vermuten lassen, dass eigentlich eher BccN64A nicht exprimiert werden würde. Eine Veränderung in der zweiten Halbhelix scheint allerdings eine größere Auswirkung auf die Expression zu haben. Abschließend lässt sich darüber nur spekulieren, da zu dem BccGlpF noch keine Strukturaufklärungen vorliegen.

Die Veränderung vom Ser186 zum Threonin zeigt einen Verlust jeglicher getesteter Leitfähigkeiten, das Einführen einer Methylgruppe könnte zu einer größeren Verengung der Pore führen und diese somit für die verschiedenen Solute nicht mehr zugänglich machen. Auch eine eventuell zusätzliche Verdrehung der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen und dadurch bedingt nicht mehr Erreichbarkeit für das jeweilige Solut wäre denkbar.

Der Austausch der Hydroxylgruppe zu einer Thiolgruppe, BccS186C, zeigte eine verringerte Methylamin-Leitfähigkeit und das Verlorengelassen von Glycerol- und Ammoniak-Leitfähigkeit. Thiolgruppen besitzen eine schwächere Wasserstoffbrückenbindung als die üblichen H-O-H-Wasserstoffbrückenbindungen, somit scheint auch die mögliche Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung von Bedeutung für den Glyceroltransport zu sein.

### 5.6 Vesikelpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit konnten NY17-Hefevesikel mit circa 100 nm Durchmesser isoliert werden (Walworth & Novick, 1997).

Nach erfolgreicher Vesikelisolation konnte allerdings bei der anschließenden Western Blot-Kontrolle kein exprimiertes Aquaporin nachgewiesen werden. Eine anschließende Kontrolle der einzelnen ersten Schritte in der Isolation ergab, dass es bei der Aufarbeitung Probleme bei dem Temperaturshift von 25°C auf 37°C gab. Bisher veröffentlichte Arbeiten zeigen keine Schwierigkeit bei der Expression von Aquaporinen in Vesikeln (Laizé *et al.*, 1995). Erklärungsversuche könnten sein, dass die bisherigen Veröffentlichungen mit induzierbaren Vektoren arbeiten, und somit eine größere Proteinmenge bezogen auf die optische Dichte einer Lösung als Ergebnis erhalten. Hier wurde mit einem konstitutiven Vektor gearbeitet, der immerzu ein gleich bleibendes Expressionslevel besitzt. Eventuell sind Temperatur bedingte

Stoffwechselveränderungen und somit einhergehende Expressionsprobleme bisher nicht zum Tragen gekommen, da aufgrund der induzierbaren Vektoren größere Proteinmengen zur Detektion zur Verfügung standen.

## 5.7 Ausblick

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit die Messung der Wasserleitfähigkeit von orthodoxen Aquaporinen und die Messung der Glycerol-Leitfähigkeit von Aquaglyceroporinen zu etablieren. Eine Erweiterung auch zur Messung der Wasserleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen wird angestrebt. Dazu wäre es denkbar und wünschenswert, weitere Solute als das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sorbitol zu testen.

Zahlreiche durchgeführte Mutationen gaben einen Einblick in die Funktion der Filterregion NPA-Motiv. Spannend wäre die Übertragung dieser Ergebnisse auf andere Aquaporine. Würden andere Aquaglyceroporine ihre Glycerol-Leitfähigkeit bei einem Austausch zum Serin behalten?

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde weiterhin die Vesikelpräparation etabliert. Es wäre wünschenswert, diese weiter zu präzisieren, um genauere Ergebnisse in der Stopped-Flow-Apparatur ermitteln zu können. Ein im Verhältnis zu Hefeprotoplasten größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis würde höhere Signale erwarten lassen und somit vielleicht auch an dieser Stelle die Wasserleitfähigkeit von Aquaglyceroporinen zugänglich werden. Zusätzlich würde eine größere Auswirkung der Glycerol-Leitfähigkeit auf die Vesikelgröße auch eine stärkere Signaländerung erwarten lassen und somit eine bessere Auswertung ermöglichen. Eine stärkere Signalstärke könnte auch die Quantifizierung erleichtern.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aquaglyceroporin des Krankenhausproblemkeims *Burkholderia cenocepacia*, BccGlpF, charakterisiert. Unter besonderer Beobachtung stand die Struktur-Funktionsbeziehung der eigentlich kochkonservierten NPA-Motive. Das BccGlpF hat natürlicherweise im ersten NPA-Motiv einen Austausch des Alanins zum Isoleucin und im zweiten NPA-Motiv ein Austausch des Asparagins zum Serin. Der außergewöhnliche Austausch zum SPA-Motiv bot somit einen exzellenten Ausgangspunkt für Veränderungen und Untersuchungen in diesem Bereich. Dazu wurden verschiedene Mutationen im NPI und SPA-Motiv, der ar/R-Region sowie der Kombination beider auf ihre Wasser-, Glycerol-, Methylamin- und Ammoniak-Leitfähigkeit untersucht.

Für die Beschreibung der Leitfähigkeiten des BccGlpF Wildtyps und der BccGlpF-Mutanten wurden *S. cerevisiae* Hefewachstumsassays verwendet, weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Stopped-Flow-Messung im Arbeitskreis etabliert. Es wurden sowohl Wasser-, wie auch Glycerolmessungen von *E. coli* und *S. cerevisiae* in der Stopped-Flow-Apparatur durchgeführt.

Zahlreiche Mutationen an den NPI/SPA-Motiven und der ar/R-Region des BccGlpF konnten erfolgreich in Hefen exprimiert werden (BccN64A, BccN64D, BccN64S, BccS186C, BccS186D, BccS186N, BccS186T, BccN64S/S186N, BccN64D/R189V und BccR189V), lediglich für BccS186A konnte keine Expression gezeigt werden. Durch die Veränderungen kam es teilweise zu einem Verlust der verschiedenen Leitfähigkeiten im Vergleich zum BccGlpF Wildtyp. BccGlpF Wildtyp konnte Methylamin, Glycerol und Ammoniak leiten, BccN64S und BccN64S/S186N ebenso, BccS186N dagegen verlor die Ammoniak-Leitfähigkeit. Bei BccN64A, BccN64D, BccS186C und BccS186D gab es nur Methylamin-Leitfähigkeit zu beobachten. BccS186T und BccN64D/R189V zeigte keine der getesteten Leitfähigkeiten.

Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass der Austausch BccN64S, BccS186N und die Kombination BccN64S/S186N nur bei BccS186N zu einer Einschränkung in der Leitfähigkeiten führte, weitere Veränderungen in den NPI/SPA-Motiven führten zu einer weiteren Einschränkung bzw. Verlust der getesteten Leitfähigkeiten.





## 7 Summary

*Burkholderia cenocepacia* is a bacterium that is considered particularly problematic in hospitals. Within this thesis, its aquaglyceroporin, BccGlpF, was characterised. The structure-function relationship of the usually highly conserved NPA-motives within this protein was of special interest. In BccGlpF, alanine is replaced by isoleucine in the first NPA-motif and asparagine is replaced by serine in the second NPA-motif. This unusual exchange resulting in an SPA-motif is an excellent starting point for further studies within this region. Thus, various mutations were made within the NPI, the SPA-motif, and the ar/R-region, another highly conserved region that is supposed to act as a selectivity filter. In addition, mutations in different regions were combined and all variants were tested in regard to their permeability for water, glycerol, methylamine, and ammonia.

In order to determine permeability of wild-type and mutant BccGlpF, yeast-based growth assays with *S. cerevisiae* were carried out and a stopped flow analysis assay was established. Thus, water as well as glycerol measurements were also done using the stopped flow instrument.

Several mutants at the NPI/SPA-motif and ar/R sites of BccGlpF were successfully expressed in yeast (BccN64A, BccN64D, BccN64S, BccS186C, BccS186D, BccS186N, BccS186T, BccN64S/S186N, BccN64D/R189V und BccR189V). Only BccS186A failed to be expressed. Due to the amino acid changes made, some mutants showed lower or even abolished permeability in comparison to wild-type BccGlpF. Wild-type BccGlpF as well as BccN64S and BccN64S/S186N were able to transport methylamine, glycerol, and ammonia, whereas BccS186N lost its ability to conduct ammonia. BccN64A, BccN64D, BccS186C, and BccS186D only showed methylamine permeability. BccS186T and BccN64D/R189V were not able to conduct any of the compounds tested.

Over all, these results show that of the amino acid changes BccN64S, BccS186N and the combination of the two, BccN64S/S186N, only BccS186N showed limited ammonia transport. Further modification within the NPI/SPA-motives resulted in additional passage limitations or in abolished permeability.



## 8 Literaturverzeichnis

Agre P (2004) Aquaporin-Wasserkanäle (Nobel-Vortrag). *Angew Chem* 116:4377-4390

Agre P (2006) The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc* 3:5-13

Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ (1993) Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol* 265:F461

Ambesi A, Allen KE, Slayman CW (1997) Isolation of transport-competent secretory vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem* 251:127-129

Beitz E (2005) Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol Cell* 97:373-383

Beitz E (2006) Aquaporin water and solute channels from malaria parasites and other pathogenic protozoa. *ChemMedChem* 1:587-592

Beitz E, Schultz JE (1999) Aquaporin-a cellular water channel as a therapeutic target? *Pharm Unserer Zeit* 28:67-73

Beitz E, Pavlovic-Djuranovic S, Yasui M, Agre P, Schultz JE (2004) Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1153-1158

Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006a) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:269-274

- Beitz E, Liu K, Ikeda M, Guggino WB, Agre P, Yasui M (2006b) Determinants of AQP6 trafficking to intracellular sites versus the plasma membrane in transfected mammalian cells. *Biol Cell* 98:101-109
- Beitz E, Becker D, von Bülow J, Conrad C, Fricke N, Geadkaew A, Krenc D, Song J, Wree D, Wu B (2009) In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity. *Handb Exp Pharmacol* 190:77-92
- Benga G (2009) Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life* 61:112-33
- Bertl A, Kaldenhoff R (2007) Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Lett* 581:5413-5417
- Bertl A, Bihler H, Kettner C, Slayman CL (1998) Electrophysiology in the eukaryotic model cell *Saccharomyces cerevisiae*. *Pflugers Arch* 436:999-1013
- Borgnia MJ, Agre P (2001) Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2888-2893
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 1999;68:425-58
- Burkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115-118
- Calamita G (2000) Understanding microbial MIP channels. *Trends Microbiol* 8:104-105
- Calamita G, Kempf B, Bonhivers M, Bishai WR, Bremer E, Agre P (1998) Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3627-3631

Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-2175

Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2110-2114

Coury LA, Mathai JC, Prasad GV, Brodsky JL, Agre P, Zeidel ML (1998) Reconstitution of water channel function of aquaporins 1 and 2 by expression in yeast secretory vesicles. *Am J Physiol* 274:F34-F42

Cymer F, Schneider D. (2010) A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* 49:279-286

de Groot BL, Grubmüller H (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294:2353-2357

de Groot BL, Grubmüller H (2004) Aquaporine: Die perfekten Wasserfilter der Zelle. *Biospektrum* 4:384-386

Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH, van Oost BA (1994) Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264:92-95

Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G (1994) Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10997-11001

Fotiadis D, Hasler L, Müller DJ, Stahlberg H, Kistler J, Engel A (2000) Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adherence. *J Mol Biol* 300:779-789

Francis P, Chung JJ, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, Wistow G, Bhattacharya SS, Agre P (2000) Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet* 9:2329-2334

Froger A, Tallur B, Thomas D, Delamarche C (1998) Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci* 7:1458-1468

Froger A, Rolland JP, Bron P, Lagrée V, Le Cahérec F, Deschamps S, Hubert JF, Pellerin I, Thomas D, Delamarche C (2001) Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. *Microbiology* 147:1129-1135

Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290:481-486

Fu D, Libson A, Stroud R (2002) The structure of GlpF, a glycerol conducting channel. *Novartis Found Symp* 245:51-61

Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361:549-552

Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta* 1788:1213-1228

Gonen T, Walz T (2006) The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* 39:361-96

Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P (2006) Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* 7:1-14

Gräfe K., Siebenand S (2009) Laropirant, Plerixafor und Tolvaptan. *Pharm Ztg* 154:3748-3751

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580

Hansen M, Kun JF, Schultz JE, Beitz E (2002) A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Biol Chem* 277:4874-4882

Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K, Yamamoto T (2001) Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun* 287:814-819

Hedfalk K, Pettersson N, Oberg F, Hohmann S, Gordon E (2008) Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expr Purif* 59:69-78

Heller KB, Lin EC, Wilson TH (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144:274-278

Hénin J, Tajkhorshid E, Schulten K, Chipot C (2008) Diffusion of glycerol through *Escherichia coli* aquaglyceroporin GlpF. *Biophys J* 94:832-839

Hohmann I, Bill RM, Kayingo I, Prior BA (2000) Microbial MIP channels. *Trends Microbiol* 8:33-38

Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372

Hub JS, de Groot BL (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1198-1203

Hub JS, Grubmüller H, de Groot BL (2009) Dynamics and energetics of permeation through aquaporins. What do we learn from molecular dynamics simulations? *Handb Exp Pharmacol* 190:57-76

Hubert JF, Duchesne L, Delamarche C, Vaysse A, Gueuné H, Raguénès-Nicol C (2005) Pore selectivity analysis of an aquaglyceroporin by stopped-flow spectrophotometry on bacterial cell suspensions. *Biol Cell* 97:675-686

Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M (2002) Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* 277:39873-39879

Ishibashi K (2006a) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochim Biophys Acta* 1758:989-993

Ishibashi K (2006b) Aquaporin superfamily with unusual npa boxes: S-aquaporins (superfamily, sip-like and subcellular-aquaporins). *Cell Mol Biol* 52:20-27

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J Biol Chem* 272:20782-20786

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S (1998) Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem Biophys Res Commun* 244:268-274

Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K (2005) Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330:832-838

Jiang Y (2009) Expression and functional characterization of NPA motif-null aquaporin-1 mutations. *IUBMB Life* 61:651-657

Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 269:14648-14654



Khademi S, O'Connell J 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305:1587-1594

King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, Agre P (2001) Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med* 345:175-179

King LS, Kozono D, Agre P (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:687-698

Kozono, D., Yasui, M., King, L. and Agre, P (2002) Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* 109:1395-1399

Laizé V, Rousselet G, Verbavatz JM, Berthoudaud V, Gobin R, Roudier N, Abrami L, Ripoche P, Tacnet F (1995) Functional expression of the human CHIP28 water channel in a yeast secretory mutant. *FEBS Lett* 373:269-274

LiPuma JJ, Spilker T, Coenye T, Gonzalez CF (2002) An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 359:2002-2003

Litman T, Søgaaard R, Zeuthen T (2009) Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. *Handb Exp Pharmacol* 190:327-358

Liu K, Kozono D, Kato Y, Agre P, Hazama A, Yasui M (2005) Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2192-2197

Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S (1995) Fps1, a yeast member of the mip family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *Embo J* 14:1360-1371

Ma T, Yang B, Verkman AS (1997) Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart. *Biochem Biophys Res Commun* 240:324-328

Mahenthiralingam E, Urban TA, Goldberg JB (2005) The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3:144-156

Mahenthiralingam E, Baldwin A, Dowson CG (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 104:1539-1551

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6:159-163

Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12:2241-2247

Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ, Saier MH Jr (1994) Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269:11869-11872

Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114

Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K (2005) Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 25:7770-7779

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605

Nakamoto RK, Rao R, Slayman CW (1991) Expression of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. *J Biol Chem* 266:7940-7949

Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW (1993) Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci* 90:11663-11667

Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA (2002) Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82:205-244

Nozaki K, Ishii D, Ishibashi K (2008) Intracellular aquaporins: clues for intracellular water transport? *Pflugers Arch* 456:701-707

Pavlovic-Djuranovic S, Schultz JE, Beitz E (2003) A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS Lett* 555:500-504

Pettersson N, Hagström J, Bill RM, Hohmann S (2006) Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 50:247-255

Potenza M, Bowser R, Müller H, Novick P (1992) SEC6 encodes an 85 kDa soluble protein required for exocytosis in yeast. *Yeast* 8:549-558

Preston GM, Carrol T, Guggino B. and Agre, P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387

Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem* 268:17-20

Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P (1994) Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 265:1585-1587

Pringle AT, Forsdyke J, Rose AH (1979) Scanning electron microscope study of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplast formation. *J Bacteriol* 140:289-293

Rojek A, Praetorius J, Frøkiaer J, Nielsen S, Fenton RA (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol* 70:301-327

Salminen A, Novick PJ (1987) A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49:527-538

Schäffner A (1998) Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204:131-139

Soveral G, Veiga A, Loureiro-Dias MC, Tanghe A, Van Dijck P, Moura TF (2006) Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology* 152:1515-1521

Stroud RM, Miercke LJ, O'Connell J, Khademi S, Lee JK, Remis J, Harries W, Robles Y, Akhavan D (2003) Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr Opin Struct Biol* 13:424-431

Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen MØ, Miercke LJ, O'Connell J, Stroud RM, Schulten K (2002) Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* 296:525-530

Tamas MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, Hohmann S (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* 31:1087-1104

Tanghe A, Van Dijck P, Thevelein JM (2006) Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol* 14:78-85

Thomas D, Bron P, Ranchy G, Duchesne L, Cavalier A, Rolland JP, Raguénès-Nicol C, Hubert JF, Haase W, Delamarche C (2002) Aquaglyceroporins, one channel for two molecules. *Biochim Biophys Acta* 1555:181-186

Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, Ishida N (2001) Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 357:688-689

Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN, Hediger MA (1998) Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem* 273:24737-24743

Uhl D (2009) Burkholderia cepacia auf der Intensivstation. *Deutsche Apo Ztg* 149:5728-5731

Unger VM (2000) Fraternal twins: AQP1 and GlpF. *Nat Struct Biol* 7:1082-1084

Uzcategui NL, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, Palmada M, Figarella K, Boehmer C, Lang F, Beitz E, Duszenko M (2004) Cloning heterologous and characterization of three aquaglyceroporins from Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* 279:42669-42676

van Heeswijk MP, van Os CH (1986) Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J Membr Biol* 92:183-193

Verkman AS (1989) Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *Am J Physiol* 257:837-850

Verkman AS (2000) Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:517-522

Verkman AS (2009) Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol* 212:1707-1715

Walworth NC, Novick PJ (1987) Purification and characterization of constitutive secretory vesicles from yeast. *J Cell Biol* 105:163-174

Walz T, Fujiyoshi Y, Engel A (2009) The AQP structure and functional implications. *Handb Exp Pharmacol* 190:31-56

Wang Y, Schulten K, Tajkhorshid E (2005) What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. *Structure* 13:1107-1118

Webb AK, Govan JR (1998) Burkholderia cepacia: another twist and a further threat. *Thorax* 53:333-334

Wraight CA (2006) Chance and design--proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757:886-912

Wu B, Beitz E (2007) Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cell Mol Life Sci* 64:2413-2421

Wu B, Altmann K, Barzel I, Krehan S, Beitz E (2008) A yeast-based phenotypic screen for aquaporin inhibitors. *Pflugers Arch* 456:717-720

Wu B, Steinbronn C, Alsterfjord M, Zeuthen T, Beitz E (2009) Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J* 28:2188-2194

Yakata K, Hiroaki Y, Ishibashi K, Sohara E, Sasaki S, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y (2007) Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta* 1768:688-693

Yasui M (2004) Molecular Mechanisms and Drug Development in Aquaporin Water Channel Diseases: Structure and Function of Aquaporins. *J Pharmacol Sci* 96:260-263

Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P (1999) Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 96:5808-5813

Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 97:397-414

Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agre P (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31:7436-7340

Zeuthen T, Wu B, Pavlovic-Djuranovic S, Holm LM, Uzcategui NL, Duszenko M, Kun JF, Schultz JE, Beitz E (2006) Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 61:1598-1608





## 9 Anhang

### 9.1 DNA- und Proteinsequenz des BccGlpF

In der folgenden Sequenz wurden die Basen und entsprechenden Aminosäuren des NPI- bzw. SPA-Motives hervorgehoben und unterstrichen. Die vermutliche ar/R-Region dagegen ist nur hervorgehoben. Die in dieser Arbeit durch Mutationen veränderten Aminosäuren wurden zur Verdeutlichung umrahmt.

ATG	TCA	CCT	TAC	ATT	GCA	GAA	TTC	ATC	GGC	ACA	GCG
M	S	P	Y	I	A	E	F	I	G	T	A
ATC	CTC	GTG	CTG	CTC	GGC	AAC	GGC	GCG	GTC	GCA	AAC
I	L	V	L	L	G	N	G	A	V	A	N
GTG	CTG	CTT	GCA	AAG	ACC	AAG	GGC	AAA	GGC	GCG	GAC
V	L	L	A	K	T	K	G	K	G	A	D
CTG	ATC	GTG	ATC	GTG	ATG	GGC	<b>TGG</b>	GCG	ATG	GCG	GTG
L	I	V	I	V	M	G	<b>W</b>	A	M	A	V
TTC	GTC	GCG	GTC	TAC	GTG	ACC	GCG	TCG	TTC	AGC	GGC
F	V	A	V	Y	V	T	A	S	F	S	G
GCG	CAC	CTG	<u>AAC</u>	<u>CCG</u>	<u>ATC</u>	GTC	AGC	ATC	AGC	CTC	GCG
A	H	L	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	V	T	I	S	L	A
CTC	GCG	GGC	AAG	TTC	GCG	TGG	TCG	AAA	GTC	GGC	GGC
L	A	G	K	F	A	W	S	K	V	G	G
TAC	GTC	CTC	GCG	CAG	ATG	CTC	GGC	GGG	ATG	GCC	GGC
Y	V	L	A	Q	M	L	G	G	M	A	G
GCG	TTG	CTC	GTG	TGG	CTC	GCG	TAT	CGC	CAG	CAC	TTC
A	L	L	V	W	L	A	Y	R	Q	H	F

GCG	AAG	GAA	GCC	GAT	GCG	GAC	CTG	AAG	CTC	GCG	GTG
A	K	E	A	D	A	D	L	K	L	A	V
TTC	TGC	ACG	GCG	CCG	GCG	ATC	CGC	AGC	GTC	ACG	CAC
F	C	T	A	P	A	I	R	S	V	T	H
AAC	GTG	CTG	ACC	GAA	GCG	ATC	TGC	ACG	TTC	GTG	CTG
N	V	L	T	E	A	I	C	T	F	V	L
ATC	CTC	GGC	GTG	CTG	TAT	CTC	GCG	TCG	CGC	CAG	GTC
I	L	G	V	L	Y	L	A	S	P	Q	V
GGC	CTC	GGC	GCA	CTC	GAC	GCG	CTG	CCC	GTC	GGC	CTG
G	L	G	A	L	D	A	L	P	V	G	L
CTG	GTG	CTC	GGC	ATC	<b>GGC</b>	ATC	TCG	CTC	GGC	GGC	CCG
L	V	L	G	I	<b>G</b>	I	S	L	G	G	P
ACC	GGC	<b>TAT</b>	GCG	ATG	<b><u>AGC</u></b>	<b><u>CCC</u></b>	<b><u>GCG</u></b>	<b><u>CGC</u></b>	GAC	CTG	TCG
T	G	<b>Y</b>	A	M	<b><u>S</u></b>	<b><u>P</u></b>	<b><u>A</u></b>	<b><u>R</u></b>	D	L	S
CCG	CGC	ATC	ATG	CAT	GCG	CTG	CTG	CCG	ATT	CCC	GGC
P	R	I	M	H	A	L	L	P	I	P	G
AAG	CGC	GAC	AGC	GAC	TGG	CGC	TAT	GCA	TGG	GTG	CCG
K	R	D	S	D	W	R	Y	A	W	V	P
GTC	GTC	GGC	CCG	CTG	CTG	GGC	GGC	GCC	GCG	GCG	GCC
V	V	G	P	L	L	G	G	A	A	A	A
GGC	CTG	TAT	CTG	CAC	CTG	CAC	ACC	ACG	ATC	TGA	
G	L	Y	L	H	L	H	T	T	I	.	

## 9.2 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Herstellung	Primer
<b>pDR196</b>	AK Prof. Beitz	
<b>pDR196 BccGlpF</b>	AK Prof. Beitz	
<b>pDR196 BccN64A</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	N64A sense N64A antisense
<b>pDR196 BccN64D</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	N64D sense N64D antisense
<b>pDR196 BccN64S</b>	AK Prof. Beitz	
<b>pDR196 BccS186A</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	S186A sense S186A antisense
<b>pDR196 BccS186C</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	S186C sense S186C antisense
<b>pDR196 BccS186D</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	S186D sense S186D antisense
<b>pDR196 BccS186N</b>	AK Prof. Beitz	
<b>pDR196 BccS186T</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	S186T sense S186T antisense
<b>pDR196 BccN64S/S186N</b>	AK Prof. Beitz	
<b>pDR196 BccN64D/R189V</b>	Mutagenese von pDR196 BccN64D	R189V sense R189V antisense
<b>pDR196 BccR189V</b>	Mutagenese von pDR196 BccGlpF	R189V sense R189V antisense
<b>pDR196 E. coli GlpF</b>	aus pRS426 E. coli GlpF mit <i>Spe</i> I und <i>Xho</i> I	
<b>pDR196 rAQP1</b>	AK Prof. Beitz	

Name	Herstellung	Primer
<b>pDR196HA</b>	aus pDR196	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccGlpF</b>	aus pDR196 BccGlpF	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccN64A</b>	aus pDR196 BccN64A	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccN64D</b>	aus pDR196 BccN64D	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccN64S</b>	aus pDR196 BccN64S	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccS186A</b>	aus pDR196 BccS186A	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccS186C</b>	aus pDR196 BccS186C	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccS186D</b>	aus pDR196 BccS186D	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccS186N</b>	aus pDR196 BccS186N	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccS186T</b>	aus pDR196 BccS186T	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccN64S/S186N</b>	aus pDR196 BccN64S/S186N	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccN64D/R189V</b>	aus pDR196 BccN64D/R189V	pDR196HA sense pDR196HA antisense
<b>pDR196HA BccR189V</b>	aus pDR196 BccR189V	pDR196HA sense pDR196HA antisense

Name	Herstellung
<b>pUG36</b>	AK Prof. Beitz
<b>pUG36 BccGlpF</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccGlpF
<b>pUG36 BccN64A</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccN64A
<b>pUG36 BccN64D</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccN64D
<b>pUG36 BccN64S</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccN64S
<b>pUG36 BccS186A</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccS186A
<b>pUG36 BccS186C</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccS186C
<b>pUG36 BccS186D</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccS186D
<b>pUG36 BccS186N</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccS186N
<b>pUG36 BccS186T</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccS186T
<b>pUG36 BccN64S/S186N</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccN64S/S186N
<b>pUG36 BccN64D/R189V</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccN64D/R189V
<b>pUG36 BccR189V</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccR189V
<b>pUG36 E. coli GlpF</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 E. coli GlpF

Name	Herstellung
<b>pQE-30</b>	Qiagen
<b>pQE-30 BccGlpF</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccGlpF
<b>pQE-80L</b>	Qiagen
<b>pQE-80L BccGlpF</b>	mit <i>Bam</i> H I & <i>Hin</i> D III aus pDR196 BccGlpF



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Die Arbeit ist entstanden unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Dorothea Wree

Kiel, April 2010





## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz.

Für die aufregende Zeit im neu entstandenen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, die Diskussionsbereitschaft und die Förderung sowie die stets offene Tür möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Meinen gesamten Arbeitskreis und den Angehörigen des Instituts danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Besonders möchte ich dabei meinen Büro-Damen danken für die unterhaltsamen gemeinsamen Jahre. Christina für die morgendliche gemeinsame Zeit im Labor. Christina und Dana für die chaotischen ersten Monate im gerade bezugsfertigen Labor. Julia und Nadine für euren Zuspruch besonders in der letzten Zeit. Björn für die vielen Stunden, die er den Autoklaven für mich im Auge behalten hat und natürlich für die unzähligen Sequenziergele. Danke an Binghua für die Einführung in die Molekularbiologie.

Vielen Dank meinen Korrekturlesern Julia und Dawid, sowie meinem Vater für die akribische Durchsicht und Verbesserungsvorschläge.

Den 1. Semester-Assistentinnen Anja, Antje, Ilka, Juliane, Sanja und Petra danke ich für die nette Praktikumszeit und eure unkomplizierte und liebe Art.

Meinen Geschwistern Konstantin, Philipp, Johanna, Alexander und Stephanie möchte ich für Ihre Ermutigung danken. Jeder von euch hat mir auf seine spezielle Art geholfen.

Navid gilt ein großes Dankeschön für die Unterstützung an jedem einzelnen Tag während der letzten Jahre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer ermutigt haben meinen Weg zu gehen und dabei immer hinter mir standen. Ohne euch hätte ich das nie geschafft.

Vielen lieben Dank euch allen!



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Dorothea Wree
Geburtsdatum	13. März 1982
Geburtsort	Köln
Nationalität	Deutsch

### Schulbildung

1988	bis 1992	Vitus-Grundschule Veitshöchheim, Würzburg
1992	bis 1996	Friedrich-König-Gymnasium, Würzburg
1996	bis 2000	Christophorus-Gymnasium, Rostock

### Studium

Okt. 2000	bis Jan. 2006	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jan. 2005	bis Juni 2005	Pharmaziepraktikantin an der Cardiff School of Biosciences, Cardiff (Wales)
Juli 2005	bis Dez. 2005	Pharmaziepraktikantin in der Famila Apotheke in Mettenhof, Kiel
Jan. 2006		Erteilung der Approbation als Apothekerin

### Berufstätigkeit

März 2006	bis Sept. 2006	Belvedere Apotheke, Kiel
-----------	----------------	--------------------------

### Promotion

seit Oktober 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Beitz
-------------------	---